

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 968 424**

51 Int. Cl.:

C11C 3/02 (2006.01)

C12P 7/64 (2012.01)

C12N 9/20 (2006.01)

A23L 33/115 (2006.01)

C11C 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.10.2018 PCT/US2018/055583**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2019 WO19075307**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2018 E 18865493 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2023 EP 3694962**

54 Título: **Aceite procesado que comprende monoacilglicéridos**

30 Prioridad:

13.10.2017 US 201762571910 P

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

09.05.2024

73 Titular/es:

**GLYCOSBIO INC. (100.0%)
2450 Holcombe Blvd., Suite J
Houston, TX 77021, US**

72 Inventor/es:

**MONTICELLO, DANIEL J. y
BUSSMANN, WERNER J.**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 968 424 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

Aceite procesado que comprende monoacilglicéridos

5 **Antecedentes**

La insuficiencia crónica en la secreción de enzimas digestivas por el páncreas se denomina insuficiencia pancreática exocrina (IPE). Sin estas enzimas digestivas, los pacientes que padecen IPE no pueden digerir apropiadamente los nutrientes en los alimentos y pueden padecer desnutrición y trastornos abdominales. La IPE es prevalente en individuos con pancreatitis crónica y otros varios trastornos digestivos crónicos. La IPE también se manifiesta en pacientes que padecen fibrosis quística. Los efectos de la IPE se pueden mitigar por el tratamiento de reemplazo de enzimas pancreáticas (TREP), en el que el individuo administra cápsulas de enzimas cada vez que se consumen alimentos. Convencionalmente, el tratamiento TREP comprende enzimas pancreáticas extraídas de páncreas porcino.

Los lípidos son compuestos energéticamente densos que son la fuente de ácidos grasos esenciales de cadena larga. Los lípidos consumidos se digieren con lipasas secretadas desde el páncreas en ácidos grasos libres (AGL) y monoacilglicérido (MAG). El bloqueo de la liberación de lipasa desde el páncreas da como resultado una digestión muy deficiente de grasas y aceites. Para los pacientes que padecen IPE, esto puede dar lugar a una desnutrición significativa porque las calorías, los ácidos grasos esenciales y los nutrientes liposolubles quedan atrapados en las partículas lipídicas no digeridas y pasan a través del sistema.

Existe una necesidad clínica no satisfecha de obtener fuentes alternativas de alimentos que se puedan consumir por individuos con IPE sin necesidad de complementación con TREP.

Las grasas y aceites parcialmente hidrolizados en forma de MAG se absorben fácilmente por individuos con IPE sin el requisito de TREP. Se han evaluado productos a base de aceite con MAG en la práctica clínica como complementos nutricionales a base de cápsulas; sin embargo, se utilizaron cápsulas para evitar el mal sabor. Para las fuentes convencionales de aceites con MAG, el aceite de partida se trata química o enzimáticamente para producir MAG, que, a continuación, se extraen con disolventes y se destilan para fraccionar los MAG de otros componentes de los aceites de partida. Estos productos con MAG se venden como productos relativamente puros que contienen solo pequeñas cantidades de AGL, DAG y TAG contaminantes, y virtualmente ningún otro compuesto. Por tanto, las fuentes convencionales de aceite con MAG a menudo carecen de otros compuestos naturales encontrados en el aceite, tales como tocoferol.

Existe una necesidad clínica de obtener productos nutricionales con una densidad calórica energéticamente muy alta que se puedan consumir por individuos con aparatos digestivos ineficaces o comprometidos. Además de los individuos con patologías pancreáticas (por ejemplo, fibrosis quística, pancreatitis y pacientes con cáncer de páncreas), otros pacientes con insuficiencia pancreática exocrina (IPE) diagnosticada o no diagnosticada se beneficiarían de los productos. Además, los individuos con disfunción biliar (colestasia) se pueden beneficiar de las grasas "predigeridas" que no requieren ácidos biliares para su emulsificación. En el mercado existen "barritas energéticas" y bebidas hipercalóricas. Sin embargo, estos productos no son adecuados para individuos que no puedan digerir (hidrolizar) las grasas en el producto. Hasta ahora, nadie ha formulado lípidos en formas líquida (batidos) y sólida (barritas) que sean adecuadas para su uso "libre de TREP".

En consecuencia, existe una necesidad de obtener alimentos de alta densidad calórica que se puedan consumir por individuos con aparatos digestivos ineficaces o comprometidos. La presente solicitud describe un procedimiento para producir un aceite modificado enzimáticamente (AME) comestible que esté sustancialmente libre de triacilglicéridos (TAG).

El documento WO 2017/019872 A18 describe un aceite con MDG que comprende un 40-60 % de monoglicéridos. El aceite con MDG puede comprender triglicéridos.

El documento WO 2015/069974 A110 describe una formulación de complemento nutricional que comprende un nutriente lipófilo y el aceite portador de MDG lipófilo.

El documento US 2004/06284 7 A1 describe una composición de aceite/grasa que comprende de un 5 a un 99,9 % en peso de un monoglicérido.

El documento US 2003/054082 A114 divulga una composición de aceite o grasa que contiene un monoacilglicerol y/o un diacilglicerol en una cantidad total de un 5-100 % en peso y que presenta un índice de estabilidad frente a la oxidación (tiempo de inducción como se mide a través de una prueba Rancimat realizada a 100 °C) de 7 o mayor, en la que el monoacilglicerol y/o el diacilglicerol contienen, como constituyentes de ácidos grasos, ácidos grasos insaturados ω 3 en cantidades de un 15-90 % en peso.

65

El documento WO 2016/066460 A1 describe una composición nutricional que comprende monoacilgliceroles sn-1(3) para su uso en el tratamiento o prevención de la mala digestión y/o malabsorción en un lactante o niño pequeño.

5 Sumario

La presente divulgación se dirige a un producto de aceite procesado derivado de una fuente de aceite, en el que el aceite procesado comprende (1) un contenido de MAG igual a o mayor de un 40 % en peso del peso total del aceite procesado; (2) un contenido de TAG igual a o menor de un 5 % en peso del peso total del aceite procesado, y (3) ingredientes no oleosos derivados de y presentes naturalmente en la fuente de aceite, de modo que dichos ingredientes no oleosos no se añadan al aceite procesado, en el que los ingredientes no oleosos se seleccionan de α -tocoferol, β -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol y γ -tocotrienol.

15 En algunos modos de realización, la fuente de aceite de dicho producto es de un origen seleccionado de una planta, un animal o un pescado.

En algunos modos de realización, los ingredientes no oleosos de dicho producto se seleccionan de antioxidantes, vitaminas y mezclas de los mismos.

20 En algunos modos de realización, dicho producto comprende más de un 1 % en peso de MAG del peso total del producto.

En algunos modos de realización, dicho producto comprende más de un 50 % en peso de MAG del peso total del producto.

25 En algunos modos de realización, la fuente de aceite es de un origen seleccionado de una planta, un animal o un pescado.

30 En algunos modos de realización, los ingredientes no oleosos se seleccionan de antioxidantes, vitaminas y mezclas de los mismos.

Breve descripción de los dibujos y figuras

35 La FIGURA 1 representa la separación por TLC de los componentes del aceite vegetal de partida, AGL intermedios y aceite con MAG final.

La FIGURA 2 representa la separación por TLC de los componentes del aceite vegetal de partida, AGL intermedios y aceite con MAG final.

40 La FIGURA 3 representa la distribución de AGL, MAG, DAG y TAG en "Ensure Original Nutritional Shake" y el producto de aceite modificado enzimáticamente de la presente divulgación ("GBFS").

45 La FIGURA 4 representa un diagrama de flujo de bloques del procedimiento de elaboración del aceite modificado enzimáticamente.

La FIGURA 5 representa la distribución de aminoácidos y péptidos en bebidas nutricionales listas para beber y proteína de guisante hidrolizada en GBFS.

50 La FIGURA 6A representa el espectro de RMN de TAG auténtico (tristerina).

La FIGURA 6B representa el espectro de RMN para el aceite modificado enzimáticamente producido a partir de aceite de almendra.

55 La FIGURA 7 representa el incremento de los triglicéridos séricos tras la ingesta del batido listo para beber a base de AME.

La FIGURA 8 representa el incremento de los triglicéridos séricos tras la ingesta de BLPB a base de MAG sin TREP.

60 Descripción detallada de la materia objeto divulgada

Se ha de entender que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada solo son ejemplares y explicativas y no son restrictivas de la invención, como se reivindica. En esta solicitud, el uso del singular incluye el plural, la palabra "un" o "una" significa "al menos uno" y el uso de "o" significa "y/o", a menos que se establezca específicamente de otro modo. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras

formas, tales como "incluye" e "incluido", no es limitante. Además, términos tales como "elemento" o "componente" engloban tanto elementos o componentes que comprenden una unidad como elementos o componentes que comprenden más de una unidad, a menos que se establezca específicamente de otro modo.

5 Los encabezados de sección usados en el presente documento son solo para propósitos organizativos y no deben interpretarse como limitantes de la materia objeto descrita. Todos los documentos, o partes de documentos, citados en esta solicitud, incluyendo, pero sin limitarse a, patentes, solicitudes de patente, artículos, libros y tratados, se incorporan expresamente en el presente documento por referencia en su totalidad para cualquier propósito. En el caso de que una o más de la literatura incorporada y materiales similares definan un término de una manera que contradiga la definición de ese término en esta solicitud, esta solicitud prevalece.

"Enriquecido" en el contexto de la presente invención significa con una cantidad mayor a la del material de partida. Por ejemplo, un aceite enriquecido con MAG es un aceite que tiene un contenido de MAG que es mayor que el contenido de MAG de partida antes del procedimiento de enriquecimiento o que el aceite de partida tiene un porcentaje mayor de MAG que el aceite poseído antes del procedimiento de enriquecimiento. El procedimiento de enriquecimiento puede ser por conversión de TAG en MAG, incrementando, de este modo, el contenido y porcentaje de MAG y disminuyendo el contenido o porcentaje de TAG.

20 Un triacilglicerol ("TAG"), también conocido como triglicérido, es un glicérido que consiste en tres cadenas de ácidos grasos unidas covalentemente a una molécula de glicerol a través de enlaces de éster. Los TAG también se pueden clasificar como que tienen una longitud de cadena larga o media. Los TAG de cadena larga contienen ácidos grasos con 14 o más carbonos, mientras que los TAG de cadena media contienen ácidos grasos con de 6 a 12 carbonos. Los TAG de cadena larga pueden incluir ácidos grasos omega-3 y omega-6. Los TAG de cadena media tienen ácidos grasos saturados y, por tanto, no contienen ácidos grasos omega-6 ni omega-3. Los TAG de cadena larga (TCL) y los triglicéridos de cadena media (TCM) pueden servir como fuentes de energía.

Un diacilglicerol ("DAG"), también conocido como diglicérido, es un glicérido que consiste en dos cadenas de ácidos grasos unidas covalentemente a una molécula de glicerol a través de enlaces de éster.

30 Un monoacilglicerol ("MAG"), también conocido como monoglicérido, es un glicérido que consiste en una cadena de ácido graso unida covalentemente a una molécula de glicerol a través de un enlace de éster. Como se usa en el presente documento, el término "aceite procesado" se refiere a una composición de aceite no natural sustancialmente libre de triacilgliceroles ("TAG") o que tiene una cantidad reducida de TAG con respecto al aceite premodificado o preprocesado.

35 Como se usa en el presente documento, un "ingrediente no oleoso" es un ingrediente que está presente naturalmente en una fuente de aceite que no sea un MAG, DAG, TAG, AGL o lípido.

40 En algunos modos de realización, los aceites de partida pueden comprender, a modo de ejemplo, pero sin limitación, aceites derivados de plantas, tales como aceite de oliva, aceite de almendra, aceite de linaza, aceite de semillas de girasol, aceite de maíz, aceite de colza, aceite de palma, aceite de soja, o aceite derivado de animales, tal como aceite de pescado, aceite de sardina o aceite de anchoa, o aceite de algas, o mezclas de los mismos. En un aspecto, el aceite de partida comprende una combinación de aceite de oliva, aceite de semillas de girasol y aceite de linaza, en el que de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80 % en peso del peso total del aceite de partida es aceite de oliva, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 % en peso del peso total del aceite de partida es aceite de semillas de girasol, y de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % en peso del peso total del aceite de partida es aceite de linaza. En otro aspecto, de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80 % en peso del peso total del aceite de partida es aceite de oliva, de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 30 % en peso del peso total del aceite de partida es aceite de linaza, y de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % en peso del peso total del aceite de partida es aceite de semillas de girasol.

55 El aceite procesado tiene un contenido de MAG igual a o mayor de un 40 % en peso en base al peso total del aceite procesado. En determinados aspectos, el contenido de MAG es de aproximadamente un 40 % a aproximadamente un 99 % en peso en base al peso total del aceite procesado. En determinados aspectos, el contenido de MAG es de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 99 % en peso en base al peso total del aceite procesado. En determinados aspectos, el contenido de MAG es de aproximadamente un 60 % a aproximadamente un 99 % en peso en base al peso total del aceite procesado. En determinados aspectos, el contenido de MAG es de aproximadamente un 70 % a aproximadamente un 99 % en peso en base al peso total del aceite procesado. En determinados aspectos, el contenido de MAG es de aproximadamente un 80 % a aproximadamente un 99 % en peso en base al peso total del aceite procesado. En determinados aspectos, el contenido de MAG es de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 80% en peso en base al peso total del aceite procesado. En cualquiera de los aspectos anteriores, el contenido de TAG es igual a o menor de un 5 % en peso en base al peso total del aceite procesado. En cualquiera de los aspectos anteriores, el contenido de TAG es igual a o menor de un 4 %, igual a o menor de un 3 %, igual a o menor de un 2 %, igual a o menor de un 1 % en peso en base al peso total del aceite procesado.

El aceite procesado comprende un contenido de MAG igual a o mayor de un 40 % en peso del peso total del aceite procesado. A modo de ejemplo, pero no limitación, el aceite procesado comprende un contenido de MAG de aproximadamente un 40 % a un 95 %, de un 50 % a un 95 %, de un 60 % a un 95 %, de un 70 % a un 95 %, de un 80 % a un 95 %, de un 90 % a un 95 %, de un 40 % a un 90 %, de un 50 % a un 90 %, de un 60 % a un 90 %, de un 70 % a un 90 %, de un 80 % a un 90 %, de un 40 % a un 80 %, de un 50 % a un 80 %, de un 60 % a un 80 %, de un 70 % a un 80 %, de un 40 % a un 70 %, de un 50 % a un 70 %, de un 60 % a un 70 %, de un 40 % a un 60 %, de un 50 % a un 60 %, de un 40 % a un 50 % o aproximadamente de un 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % en peso del peso total del aceite procesado.

El aceite procesado está libre de TAG o bien comprende un contenido de TAG que es igual a o menor de un 5 % en peso del peso total del aceite procesado. A modo de ejemplo, pero no limitación, el aceite procesado comprende un contenido de TAG que es aproximadamente de un 0 % a un 5 %, de un 1 % a un 5 %, de un 2 % a un 5 %, de un 3 % a un 5 %, de un 4 % a un 5 %, de un 0 % a un 4 %, de un 1 % a un 4 %, de un 2 % a un 4 %, de un 3 % a un 4 %, de un 0 % a un 3 %, de un 1 % a un 3 %, de un 2 % a un 3 %, de un 0 % a un 2 %, de un 1 % a un 2 %, de un 0 % a un 1 % o de un 0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % o 5 % en peso del peso total del aceite procesado. A modo de otro ejemplo, pero sin limitación, el contenido de TAG puede ser menor de un 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o 0,1 %.

El aceite procesado comprende ingredientes no oleosos derivados de y presentes naturalmente en la fuente de aceite de modo que los ingredientes no oleosos no se añadan al aceite procesado, en el que los ingredientes no oleosos se seleccionan de alfa-tocoferol, beta-tocoferol, delta-tocoferol, gamma-tocoferol, alfa-tocotrienol, beta-tocotrienol, delta-tocotrienol o gamma-tocotrienol.

Ejemplos

Ejemplo 1: procedimiento de producción de un producto enriquecido en MAG en comparación con un aceite rico en TAG de partida.

El procedimiento de producción de un producto enriquecido en MAG en comparación con el aceite rico en TAG de partida implica 3 etapas clave: (1) Una reacción suave catalizada enzimáticamente para hidrolizar triglicéridos (TAG) en una secuencia que convierte los aceites neutros en combinaciones específicas de AGL, MAG, DAG y pocos TAG residuales; (2) una esterificación con glicerol para generar cantidades predominantemente altas de MAG, lo que deja bajas concentraciones de AGL; y (3) aislamiento del producto lipídico modificado; esto se logra por separación de fases con o sin ayuda de una centrifugadora.

Etapa 1: conversión enzimática de triacilgliceroles

Preparación de la solución tampón. Se preparó una solución de citrato de sodio (100 mM, pH 5,8) en un reactor de depósito agitado. Se colocaron 11,1 l de agua desionizada (DI) en el recipiente de mezcla, se fijó el agitador en 200 RPM y se añadieron 0,213 kg de ácido cítrico (anhidro). Después de que se disolviera el polvo, se ajustó el pH con solución de hidróxido de sodio a pH = 5,8 (aproximadamente 0,121 kg). Se retiraron 220 ml para la posterior preparación enzimática.

Preparación de la solución enzimática. En un frasco separado de 250 ml, se preparó la solución enzimática bajo agitación suave: se colocaron 200 ml de la solución tampón de citrato en el recipiente de mezcla. Se añadieron 10 g de Lipasa AY AMANO y se agitó el frasco hasta que se disolvió la enzima.

Conversión de una mezcla de aceites con triglicéridos. Se añadieron al recipiente tres aceites vegetales, aceite de oliva, aceite de linaza y aceite de semilla de girasol para dar un total de 10 kg de mezcla de aceites vegetales. Se aplicó vacío para bajar la presión a aproximadamente 20 mmHg y desgasificar el material (en particular, de cualquier oxígeno disuelto). Se fijó la agitación a 200 RPM y la mezcla se calentó a 33 °C y se agitó durante aproximadamente 15 min para retirar cualquier gas disuelto. A continuación, se reemplazó el vacío por una atmósfera de gas nitrógeno. Una vez que la mezcla estuvo suficientemente dispersada, se añadieron 220 ml de la preparación enzimática en solución tampón. Se continuó la agitación y se supervisó la reacción durante 24 horas hasta que se completó la conversión a AGL en base al análisis por TLC.

La temperatura del reactor se incrementó a 70 °C y se reanudó la agitación durante 1 hora para inactivar la enzima.

Se detuvo la agitación y las fases se separaron en aproximadamente 60 minutos.

La fase acuosa (inferior) se retiró junto con una pequeña cantidad de la fase oleosa para garantizar que se eliminaba la proteína residual en la interfase.

Etapas 2. Esterificación con Glicerol. Típicamente, cuando los AGL se reesterifican con glicerol, producen una mezcla de MAG, DAG y TAG. Se descubrió que, al reducir significativamente la temperatura (por debajo de 25 °C) y retirar el agua (por evaporación) a medida que se forma en la reacción, la proporción de MAG en el producto se puede enriquecer mucho (al menos un 60 %, pero hasta un 95 %). Esto fue inesperado.

En la reacción, el producto de reacción de la etapa 1 (aproximadamente 10 l) se enfrió a aproximadamente 30 °C y se agitó a 300 RPM. Se añadieron 10 kg de glicerol de calidad alimentaria a la mezcla de lípidos y se mantuvo la temperatura a ~30 °C. La mezcla se agitó para generar una dispersión del aceite y glicerol. Para secar la mezcla de reacción se aplicó vacío: en primer lugar, se aplicó un vacío (25 mmHg, Torr) con el receptor en posición para recoger agua. Una vez que se detuvo la evaporación del agua residual, se añadieron al reactor 20 g de Lipasa G Amano disuelta en agua (50 ml). La temperatura se redujo a 23 °C y el vacío se cambió a 5 mmHg usando una bomba de diafragma de aceite y una trampa fría para recoger el agua. La mezcla se agitó a 300 RPM a 23 °C a vacío durante 72 h, momento en el que se interrumpió el vacío y la mezcla se cubrió con gas nitrógeno. La mezcla se analizó después de 72 horas con TLC para evaluar la conversión a MAG como se muestra en la FIGURA 1.

Etapas 3. Inactivación de lipasa y separación de fases. Una vez que se completó la reacción, se inactivó la lipasa calentando la mezcla (bajo una atmósfera de gas nitrógeno) a 70 °C durante 1 h. En este punto, el aceite con MAG y el glicerol están bien mezclados y es muy difícil separarlos a través de procedimientos tradicionales de gravedad o centrífugos. Después de una experimentación considerable, se descubrió que el lípido se puede separar del exceso de glicerol añadiendo un 0,3 % en peso de sal (NaCl) a la mezcla de reacción bajo agitación. A continuación, se dejó enfriar la mezcla de productos a aproximadamente 60 °C y se dejó sin agitación durante aproximadamente 1 h.

La fase oleosa lipídica se separó de la fase de glicerol más pesada restante. Se retiró la fase de glicerol: contiene algo de sal, agua residual y la enzima inactivada disuelta que está contenida en la interfase visible. La fase de glicerol se puede reutilizar después de la filtración con membrana y se debe conservar para su reciclaje. Se añadió tocoferol (vitamina E) para dar una concentración de 200 ppm (0,02 % en peso) del aceite producto. El aceite hidrolizado (aproximadamente 10 kg estaban listos para su uso y se podían almacenar bajo una atmósfera de nitrógeno).

Almacenamiento de productos. Los productos hidrolizados finales se transfirieron a recipientes de calidad alimentaria con una atmósfera de gas nitrógeno para su almacenamiento y transporte.

Ejemplo 2: caracterización del aceite producido en el ejemplo 1.

Los productos de reacción y el procedimiento global se pueden evaluar usando cromatografía en capa fina y cromatografía de gases.

Pruebas de cromatografía en capa fina. Los componentes de las muestras de aceite se separaron usando placas de TLC (Analtech Uniplat Silica Gel GHL con aglutinante inorgánico, 20 x 20 cm, 250 µm). El disolvente fue solución de hexano:éter dietílico:ácido acético (70:30:1). Los tamaños de muestra típicos fueron de 3 µl. Después de que el frente del disolvente llegara hasta cerca de la parte superior de la placa (~1 cm), se retiraron las placas del depósito de TLC y el disolvente se evaporó en una campana extractora. Los componentes se visualizaron con vapores de yodo (a temperatura ambiente) en un depósito de TLC y se estimaron las intensidades relativas por formación de imágenes colorimétricas (formador de imágenes Amersham 600). Después de 15 minutos en el depósito, se retiraron las placas y se fotografiaron. La intensidad de las manchas disminuyó después de 30 - 60 minutos.

Se realizó la determinación de las propiedades físicas para establecer la consistencia, color, contenido de agua, grasas y aceites (miscibles) del producto.

La FIGURA 1 representa los resultados finales de las etapas de 1 a 3 en el procedimiento de producción de un producto enriquecido en MAG en comparación con el aceite rico en TAG de partida como se describe en el ejemplo 1. La FIGURA 2 ilustra que el tocoferol inicialmente presente en el aceite de oliva se conserva siguiendo las etapas descritas en el ejemplo 1. En la FIGURA 2, se puede ver la mancha de tocoferol que se define por encima de la mancha de TAG en los tres carriles.

Pruebas de perfiles de ácidos grasos: cromatografía de gases. Se analizaron los componentes lipídicos, incluyendo ácido cáprico C10:0, ácido láurico C12:0, ácido mirístico C14:0, ácido palmítico C16:0, ácido esteárico C18:0, ácido oleico C18:1, ácido linoleico C18:2 y ácido alfa-linolénico C18:3. El ácido linolénico se analizó después de la derivatización como ésteres metílicos de ácidos grasos y se comparó con patrones. Para la derivatización, se añadió una muestra (500 µl) a un tubo de reacción de 5 ml que contenía 2 ml de solución de trifluoruro de boro (12 % en metanol), 20 µl de dimetoxipropano y 100 µl de una solución de patrón interno de ácido tridecanoico (10 mg/ml). El tubo de reacción se agitó en vórtex y se incubó en un bloque de calentamiento a 60 °C durante 30 minutos.

Se retiró el tubo de reacción del bloque de calentamiento y se dejó que enfriara durante 15 minutos. A continuación, se añadió 1 ml de agua destilada para desactivar la reacción, seguido de 1 ml de hexano. El tubo de reacción se agitó en vórtex durante 60 segundos y se dejó que las fases se separaran durante 3 minutos. Se retiró la fase superior (hidrófoba) en un tubo de 1,5 ml que contenía aproximadamente 50 mg de sulfato de sodio (anhidro). Después de agitar en vórtex durante 60 segundos, se centrifugó el tubo de 1,5 ml y se transfirieron ~500 µl de la fase hidrófoba seca y clarificada a un vial de muestra de cromatografía de gases.

Las muestras se analizaron usando un cromatógrafo de gases Agilent 7890A con detector de ionización de llama y el programa informático Agilent Openlab CDS Chemstation. Columna de CG: columna Omegawax 100 (15 m x 0,1 mm x 0,1 µm). Los resultados se convirtieron en % en peso por referencia a patrones internos.

La FIGURA 3 representa la distribución de AGL, MAG, DAG y TAG en Ensure y un producto GBFS de la presente divulgación. Los AGL, MAG, DAG y TAG porcentuales en los aceites se determinaron por cromatografía en capa fina.

Ejemplo 3: otro ejemplo del procedimiento de producción de un producto enriquecido en MAG en comparación con un aceite rico en TAG de partida.

El siguiente procedimiento se representa por el diagrama de flujo de bloques en la FIGURA 4.

Se añadió aceite vegetal a ácido cítrico e hidróxido de sodio (cáustico) en agua DI y se calentó a 33 °C/-2 °C. Se aplicó bajo vacío para desgasificar y retirar el oxígeno. Se añadió lipasa AY. La hidrólisis de la mezcla se realizó durante 14 - 24 horas bajo una atmósfera de nitrógeno a una temperatura de 33 °C/-2 °C.

La lipasa se inactivó a una temperatura de 70 °C/-2 °C durante 1 hora. Se drenó la fase acuosa con la enzima inactivada. Se añadió glicerol. A continuación, la reacción se enfrió a 22 °C/-2 °C. A continuación, se añadió lipasa G y se evaporó el agua bajo vacío moderado.

La reesterificación se llevó a cabo durante 72 horas a alto vacío (alrededor de 720 mmHg) a una temperatura de 20 °C/-2 °C. La lipasa G se inactivó a 70 °C/-2 °C durante una hora y se añadió sal a la reacción.

La inactivación enzimática y la separación de fases se llevó a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora a 70 °C/-2 °C. Se drenó la fase acuosa con la enzima inactivada, glicerol y sal. La reacción se enfrió a 60 °C/-2 °C. Se añadió antioxidante. El producto final se almacenó a 4 °C/-2 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

Ejemplo 4: formulación lista para beber que incorpora MAG y proteína hidrolizada

Se produjo un producto de la presente divulgación como una formulación de "batido de leche" convencional que incluye una fuente de grasas, proteínas, carbohidratos, vitaminas y fibra además de los tensioactivos y agentes estabilizantes tradicionales típicamente encontrados en estos productos. Una ración individual era de 250 ml. Los ingredientes que aparecían en la etiqueta de ingredientes eran como sigue: agua, sirope de agave ecológico, proteína de guisante hidrolizada, combinación de aceites hidrolizados, goma arábica, lecitina de girasol, goma xantana, oligosacáridos, sorbato de potasio, benzoato de sodio, café instantáneo, saborizante natural de vainilla ecológica, vitamina C, succinato de vitamina E, palmitato de vitamina A, niacinamida, pantotinato de D-calcio, pirodoxina HCl, tiamina HCl, riboflavina, vitamina D3, ácido fólico, cianocobalamina, vitamina K2.

Los carbohidratos se suministraron en forma de azúcares simples (glucosa y fructosa) de frutas y siropes de agave.

La proteína en el producto era proteína de guisante parcialmente hidrolizada (PURIS Pea Protein 870H, World Food Processing LLC, Turtle Lake, WI 54889).

También se produjo proteína de guisante hidrolizada (PGH) extensamente con péptidos en un intervalo de tamaños más biodisponible para el transporte a través de la pared intestinal. Se produjo la PGH por otra hidrólisis enzimática. Por ejemplo, se disolvió proteína de guisante parcialmente hidrolizada (Puris Pea Protein 870H descrita anteriormente) en tampón de fosfato 100 mM hasta una concentración de 25 mg/ml. Se añadió la enzima y la reacción se incubó a 50 °C durante la noche. Se evaluaron tres enzimas GRAS comerciales diferentes: alcalasa, termoasa y Flavourzyme.

El tamaño promedio y la distribución de los péptidos en las muestras de proteína se evaluaron usando cromatografía de exclusión por tamaño. Las muestras se disolvieron en tampón fosfato 100 mM, pH 6,8 hasta una concentración de 25 mg/ml y se analizaron en un HPLC Shimadzu con detector UV (214 nm) usando una columna Phenomenex Yarra 3 µm SEC-2000 (eluida con tampón fosfato de sodio 100 mM) (pH 6,8), caudal de 0,8 ml/min a temperatura ambiente). Las muestras se compararon con un patrón de peso molecular (parte de patrón de Phenomenex SEC ALO-3042). Se estimaron los tamaños usando una curva de calibración generada a

partir de patrones de peso molecular conocidos. El tamaño promedio de la proteína de guisante no hidrolizada fue de ~200 aminoácidos. El tamaño promedio del material parcialmente hidrolizado de Puris Pea 870H fue de 34 aminoácidos, con una cantidad sustancial en el intervalo de 2-40 aminoácidos, similar a otros productos de hidrolizado de proteína (a base de lactosuero).

5 La FIGURA 5 representa la distribución de aminoácidos y péptidos en bebidas nutricionales listas para beber como se informa en E. Phillips *et al.*, 2005 Peptide-Based Formulas: the Nutraceuticals of Enteral Feeding? EPCN October:40-45 en comparación con la proteína de guisante hidrolizada extensamente en GBFS descrita anteriormente. La FIGURA 5 representa el porcentaje de aminoácidos (eje Y) del tamaño de 1 aminoácido, 2-4
10 aminoácidos, 9-10 aminoácidos, 10-40 aminoácidos o más de 40 aminoácidos en los productos Oeotamen, Perative, Cricual, Pivot y GBFS de la presente divulgación (eje X). El tamaño promedio de la PGH en GBFS es de 3-4 aminoácidos, mayoritariamente 1-7 aminoácidos.

15 La grasa se proporciona en forma de lípido MAG reestructurado y se produjo a partir de una combinación de aceite de oliva (70 %), aceite de girasol (21 %) y aceite de linaza (9 %) para proporcionar la energía y otros beneficios de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), AGPI omega-6 y AGPI omega-3. La proporción omega-6/omega-3 es de ~4/1.

20 La goma arábiga, lecitina de girasol y goma xantana son ingredientes alimentarios GRAS comunes usados para proporcionar estructura y estabilidad a la bebida. Los oligosacáridos proporcionan fibra no digerible. El sorbato de potasio y benzoato de sodio son conservantes alimentarios comunes. El café instantáneo y la vainilla proporcionan sabor.

25 Se incluyó un envase de vitaminas que incluía vitaminas liposolubles e hidrosolubles.

En la tabla 1 se muestra un prototipo de etiqueta nutricional del producto. En la tabla 1, los ** valores diarios porcentuales (% VD) se basan en una dieta de 2000 calorías. † Valor diario (VD) no establecido.

| Información complementaria | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------|---------|
| Tamaño de ración de 250 ml | | | |
| | Cantidad por ración | | % VD ** |
| Calorías | 379 | kcal | |
| Grasa total | 19 | g | 24 % |
| Colesterol | - | mg | 0 % |
| Carbohidratos totales | 32 | g | 12 % |
| | Fibra alimenticia | 2 g | 7 % |
| | Azúcares | 30 g | |
| Proteína | 20 | g | 40 % |
| Vitamina A | 320 | mcg | 35 % |
| Vitamina C | 480 | mg | 35 % |
| Vitamina D | 7 | mcg | 35 % |
| Vitamina E | 5 | mg | 35 % |
| Vitamina K | 42 | mcg | 35 % |
| Tiamina | 400 | mcg | 35 % |
| Riboflavina | 450 | mcg | 35 % |

| Información complementaria | | | |
|-----------------------------------|---------------------|------|---------|
| Tamaño de ración de 250 ml | | | |
| | Cantidad por ración | | % VD ** |
| Calorías | 379 | kcal | |
| Niacina | 6 | mg | 35 % |
| Vitamina B6 | 600 | mcg | 35 % |
| Folato | 132 | mcg | 35 % |
| Vitamina B12 | 1 | mcg | 35 % |
| Biotina | 10 | mcg | 35 % |
| Ácido pantoténico | 2 | mg | 35 % |
| Calcio | 480 | mg | 35 % |
| Hierro | 6 | mg | 35 % |
| Fósforo | 450 | mg | 35 % |
| Cloruro | - | mg | † |
| Sodio | 175 | mg | 7 % |
| Potasio | 1600 | mg | 35 % |

- 5 Evaluación sensorial. Se descubrió que los AGL producidos a partir de la combinación de aceites vegetales eran desagradables por un panel de catadores. De forma sorprendente, el aceite con MAG producido a partir de esta combinación era agradable y similar en sabor y textura al aceite con triglicéridos original. Cuando el aceite con MAG se formuló en el producto LPB descrito anteriormente, el sabor era aceptable e indistinguible de productos comerciales similares con proteínas y lípidos intactos (no digeridos).

Ejemplo 5: producción de múltiples lotes de AME

- 10 Se evaluó el momento del procedimiento descrito en el ejemplo 1 para elaborar el AME para generar aceite que tenía un contenido de MAG mayor de un 70 %, de MAG + AGL mayor de >85 % y de TAG de un 5 % o menor.

- 15 La tabla 2 representa un examen de placas de TLC que ilustra las concentraciones de MAG y AGL en el AME modificado enzimáticamente producido a partir de una combinación de aceite de oliva/aceite de lino/aceite de girasol (proporción de 7/2/1). En estos experimentos, la etapa 2 se extendió a 84 horas para establecer límites superiores de tiempo y temperatura para evitar la formación de TAG.

| Experimento | TAG | DAG | MAG | AGL | AGL + MAG |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----------|
| 1 | 4 | 26 | 56 | 13 | 70 |
| 2 | 4 | 11 | 73 | 13 | 85 |
| 3 | 5 | 10 | 76 | 9 | 85 |

- 20 La reacción se puede supervisar esencialmente en tiempo real con análisis por TLC y detener en cualquier punto durante la etapa 2 para proporcionar las cantidades deseadas de MAG, DAG, TAG y AGL. Se descubrió que un tiempo de reacción de 72 horas para la etapa 2 era un punto de detención práctico y productivo y se ilustra en el ejemplo 6.

- 25 **Ejemplo 6: evaluación de aceite de almendra modificado enzimáticamente libre de TAG por análisis de RMN.**

Se produjo AME libre de TAG usando aceite de almendra. Las condiciones de reacción fueron como se describe en el ejemplo 1. La etapa 2 fue de 72 horas para minimizar la producción de TAG.

- Las FIGURAS 6A-6B representan el análisis por RMN ^{13}C del AME producido a partir de aceite de almendra. La FIGURA 6A ilustra que la señal de RMN ^{13}C se asoció con TAG auténtico (tristerina) y los picos característicos a 62,173 ppm y 68,921 ppm. La FIGURA 6B ilustra la señal de RMN ^{13}C para el AME. Muestra que no hay señales de TAG discernibles. La integración de las señales reales indica una distribución de acilglicerol entre MAG:DAG de un 88 %:12 %. Las muestras se analizaron en un espectrómetro de RMN JEOL, modelo ECA600II, que funciona a 600 MHz de protones y 150 MHz de carbono. Las muestras se prepararon en tubos de 5 mm y se procesaron bloqueadas con CDCl_3 a temperatura ambiente.
- 5
- 10 Por lo tanto, la presente invención está bien adaptada para alcanzar los fines y ventajas mencionados, así como aquellos que son inherentes a la misma. Aunque se pueden realizar numerosos cambios por los expertos en la técnica, dichos cambios se engloban dentro del espíritu de la presente invención, como se ilustra por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un aceite procesado derivado de una fuente de aceite, en el que el aceite procesado comprende (1) un contenido de MAG igual a o mayor de un 40 % en peso del peso total del aceite procesado; (2) un contenido de TAG igual a o menor de un 5 % en peso del peso total del aceite procesado, y (3) ingredientes no oleosos derivados de y presentes naturalmente en la fuente de aceite, de modo que dichos ingredientes no oleosos no se añadan al aceite procesado, en el que los ingredientes no oleosos se seleccionan de α -tocoferol, β -tocoferol, δ -tocoferol, γ -tocoferol, α -tocotrienol, β -tocotrienol, δ -tocotrienol y γ -tocotrienol.
- 10 2. El aceite procesado de la reivindicación 1, en el que dicha fuente de aceite es de un origen seleccionado de una planta, un animal, algas o pescado.
- 15 3. El aceite procesado de la reivindicación 1, en el que dicha fuente de aceite es de origen vegetal.
4. El aceite procesado de la reivindicación 1, en el que dicha fuente de aceite se selecciona del grupo que consiste en aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de maíz, aceite de almendra, aceite de colza, aceite de palma, aceite de soja, aceite de linaza y mezclas de los mismos.
- 20 5. El aceite procesado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende un contenido de MAG de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 95 % en peso en base al peso total del aceite procesado.

FIGURA 1

Resultado final típico

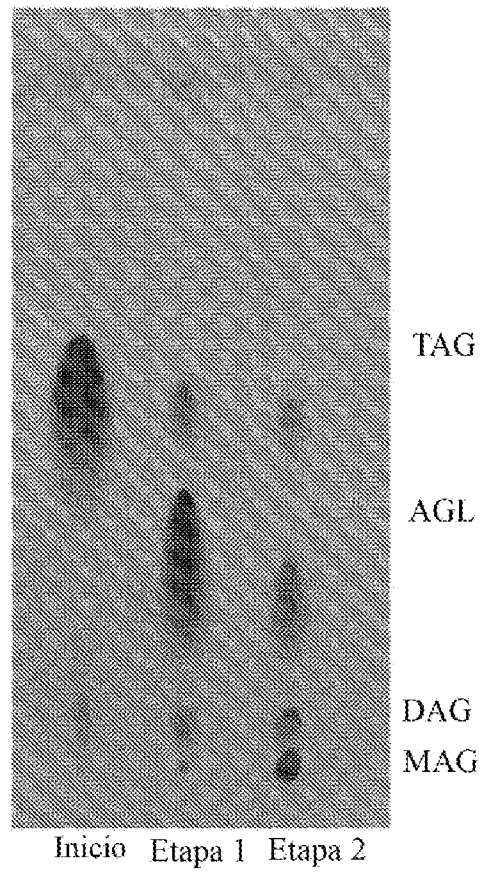


FIGURA 2

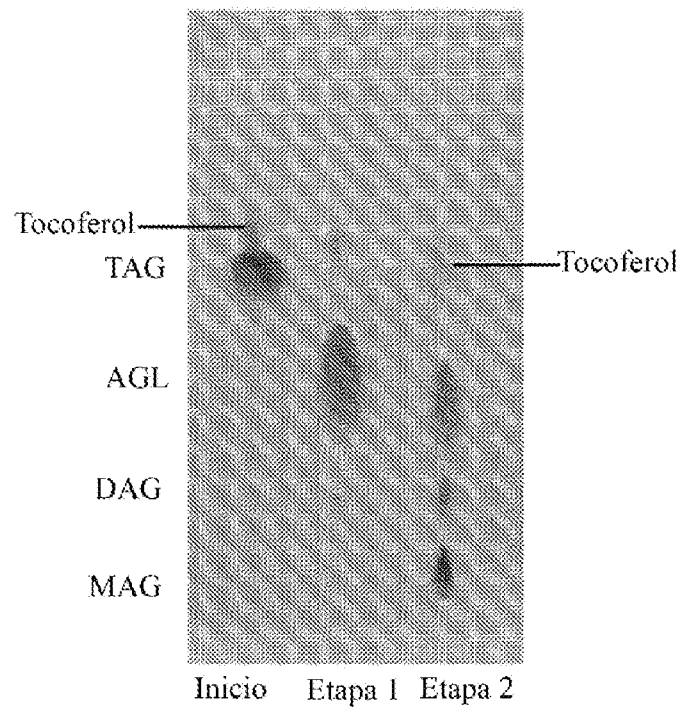


FIGURA 3

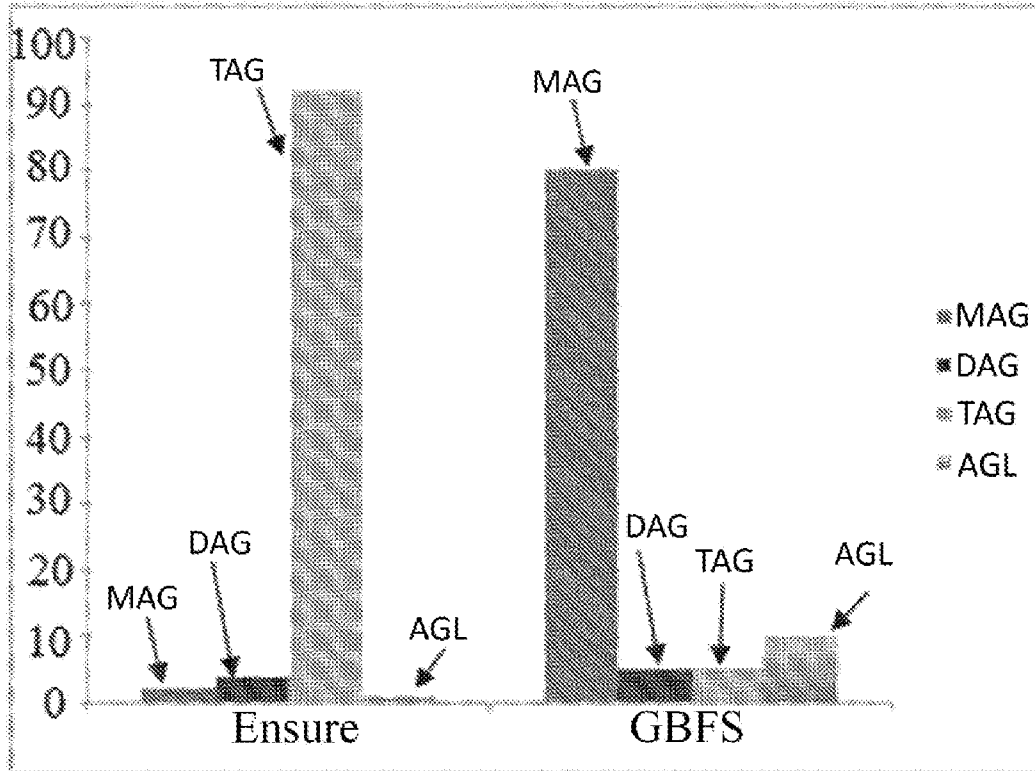
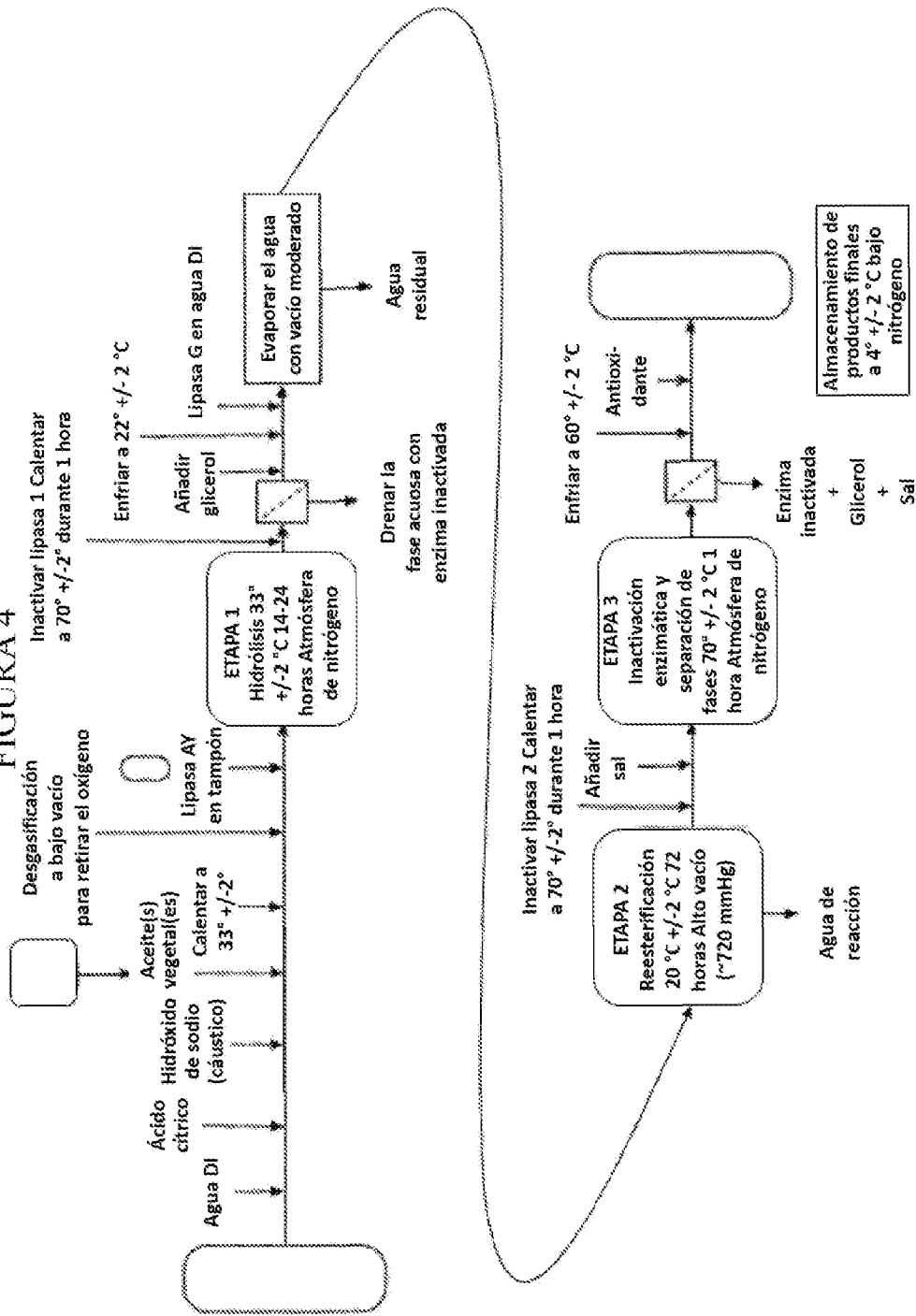


FIGURA 4



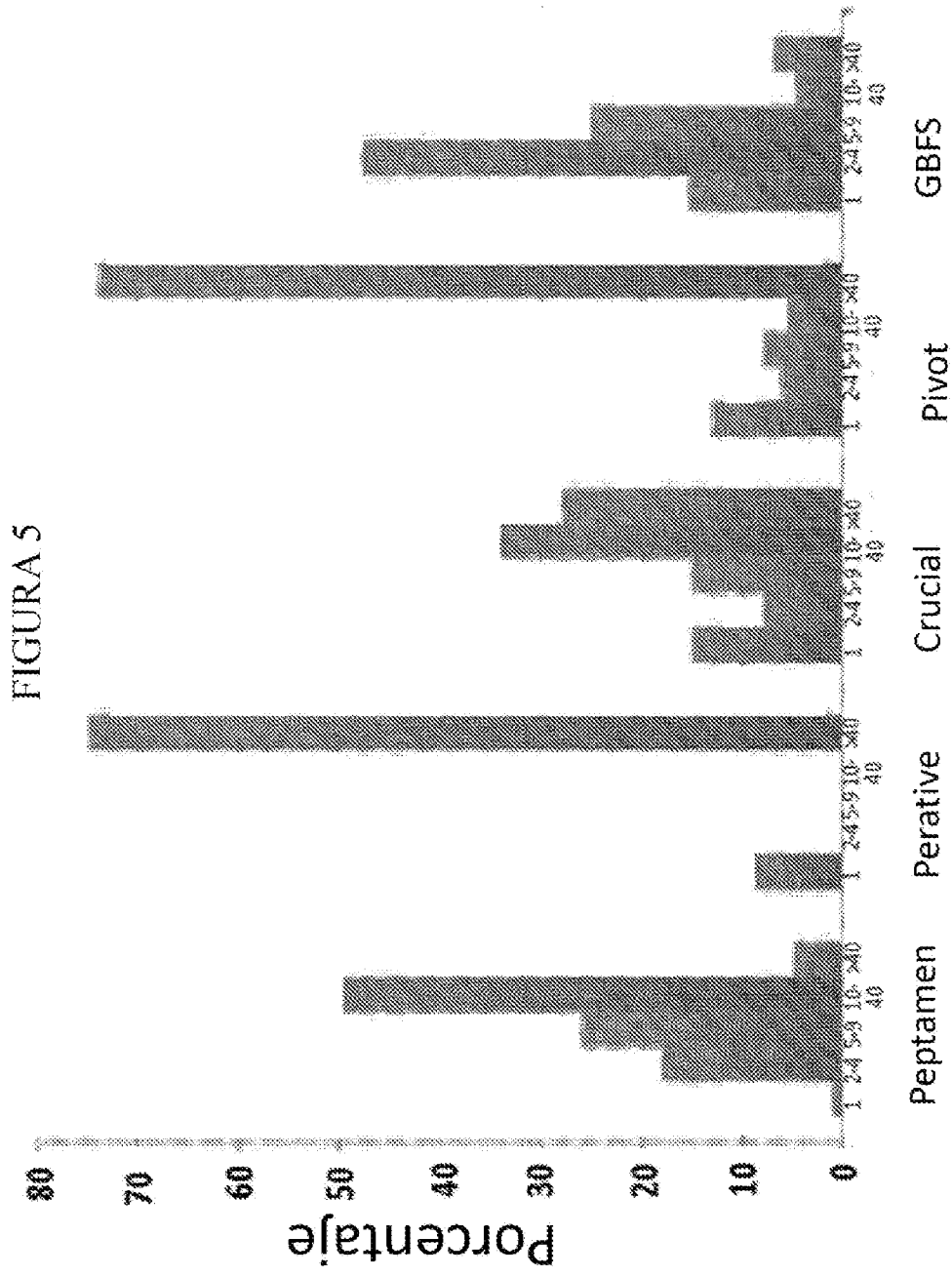


FIGURA 6A

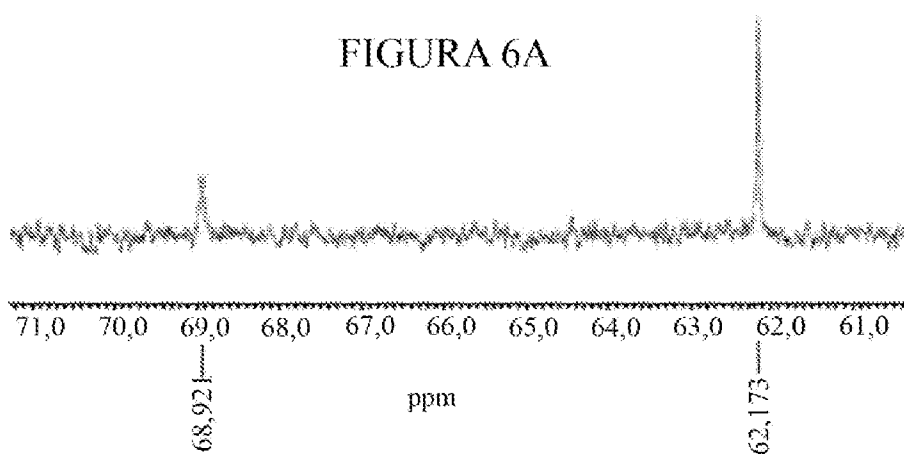


FIGURA 6B

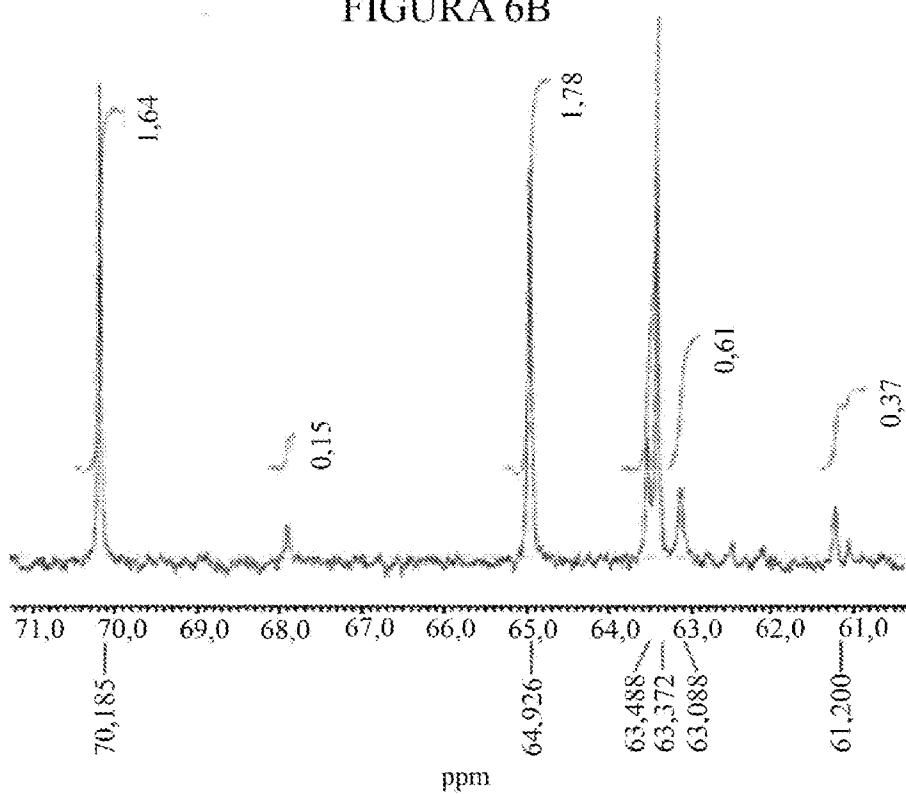


FIGURA 7

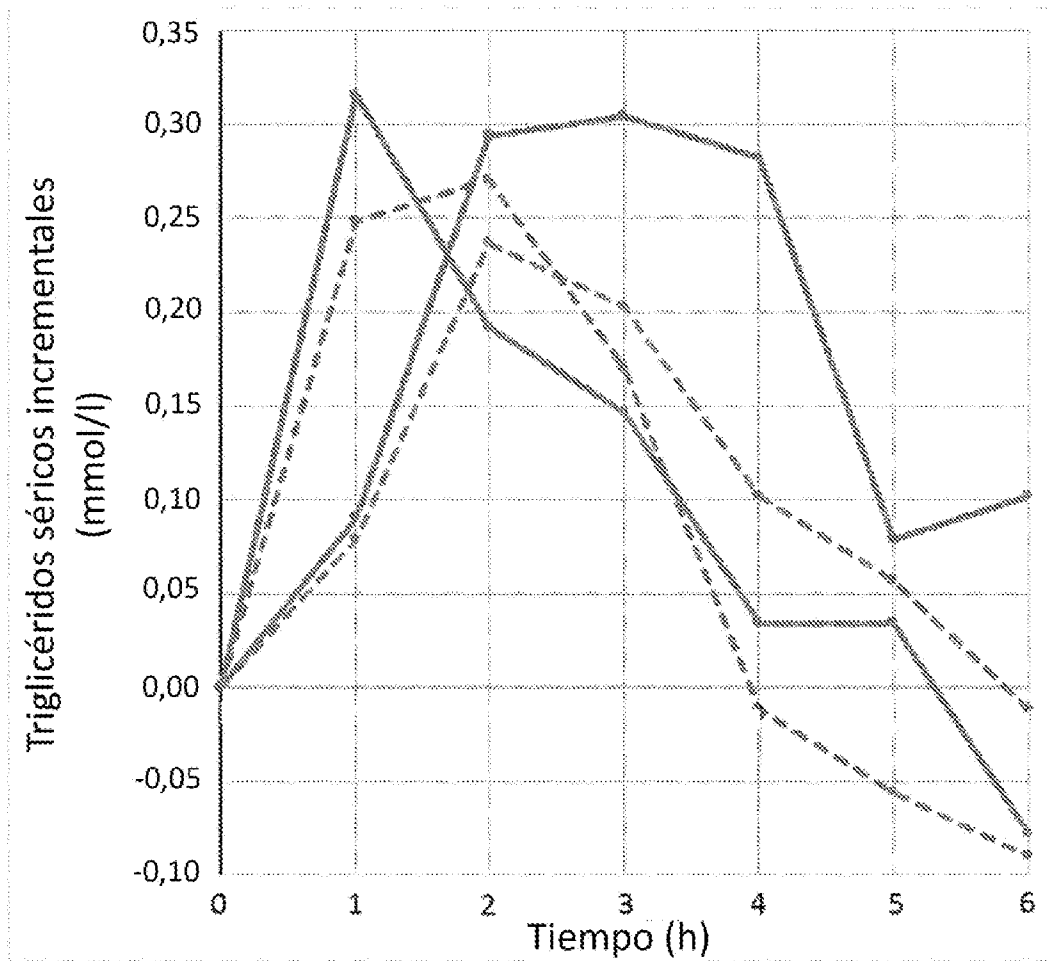


FIGURA 8

