



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0609628-0 B1

(22) Data do Depósito: 15/05/2006

(45) Data de Concessão: 14/02/2017



(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR GORDURAS OU ÓLEOS

(51) Int.Cl.: C11B 3/10; C11C 3/00; C11C 3/04

(30) Prioridade Unionista: 12/05/2006 US 11/432.494, 13/05/2005 US 60/680.483

(73) Titular(es): ARCHER-DANIELS-MIDLAND COMPANY

(72) Inventor(es): THOMAS P. BINDER; SCOTT BLOOMER; INMOK LEE; LEIF SOLHEIM; LORI WICKLUND

“MÉTODO PARA PRODUZIR GORDURAS OU ÓLEOS”

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Campo da Invenção

[001] A presente abordagem diz respeito a métodos para produzir gorduras e óleos. Especificamente, a presente abordagem diz respeito ao prolongamento da atividade enzimática de uma enzima usada para transesterificação ou esterificação de um substrato para a produção de gorduras e óleos por purificação do substrato antes da transesterificação ou esterificação.

Técnica relacionada

[002] Lipases (triacilglicerol acilidrolases, EC 3.1.1.3) são capazes de catalisar uma variedade de reações. Tais enzimas são comercialmente disponíveis de uma ampla faixa de fabricantes e organismos, e são usadas em reações catalíticas com óleos e gorduras de consumo. *Ver, por exemplo, Xu, X., “Modification of oils and fats by lipase-catalyzed interesterification: Aspects of process engineering”, in Enzymes, in Lipid Modification, 190-215 (Bomscheuer, U. T., ed., Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinbeirn, Germany, 2000).* Lipases são usadas para hidrolisar glicerídeos tais como triacilgliceróis e fosfatídeos. Eles também são usados na síntese de ésteres de ácidos graxos e álcoois industriais. Além do mais, lipases são usadas para alcoólises (trocando álcoois ligados a ésteres) para produtos tais como biodiesel e glicerídeos parciais. Lipases também podem ser usadas para catalisar reações de troca de acila tal como interesterificação (também conhecido como transesterificação) de substratos de éster mistura-

do para criar misturas únicas de triacilgliceróis com características funcionais desejadas.

[003] Biocatalisadores, tais como lipases também são atrativos por causa do seu uso sob condições de operação brandas e seus altos graus de seletividade. Biocatalisadores também oferecem caminhos sintéticos que evitam a necessidade para produtos químicos ambientalmente prejudiciais.

[004] Lipases são adicionalmente usadas para a fabricação de glicerídeos exclusivos. Por exemplo, 1,3-lipases específicas são usadas na fabricação de 1,3-diglicerídeos, como descrito, por exemplo, em Patente U.S. No. 6.004.611.

[005] A reação de transesterificação tem também se tornando uma solução importante para uma ameaça recentemente identificada para a saúde humana: ácidos graxos trans. Esses ácidos graxos trans foram há muito desejados por suas características funcionais no uso de alimento e foram produzidos em escala de bens de consumo por hidrogenação parcial de óleos vegetais. Assim, eles foram facilmente disponíveis e relativamente baratos por décadas. Atualmente, fornecedores de produtos alimentícios estão procurando gorduras para substituir óleo vegetal parcialmente hidrogenado, preferivelmente a preços equiparáveis ou mais altos. Transesterificação de gorduras e óleos propriamente selecionados podem fornecer gorduras para substituir óleo vegetal parcialmente hidrogenado. Se tais gorduras são produzidas por transesterificação de gorduras e óleos livres de ácidos graxos trans, ácidos graxos trans serão substancialmente ausentes a partir de gordura transesterificada. A seleção adequada de composições de ácido

graxo de gorduras e óleos de partida fornecerá funcionalidade adequada nas gorduras de substituição transesterificadas por óleo parcialmente hidrogenado vantajosamente sintetizados por interesterificação catalisada por lipase.

[006] A estabilidade de biocatalisadores tal como lipases é mais convenientemente expressa em termos de meia vida, que é o tempo após o qual a atividade do catalisador inicial tem diminuído pela metade o valor original. Diks, Rob M. M., "Lipase stability in oil", *Lipid Technology*, 14(1): 10-14 (2002). Um outro meio de expressar estabilidade da enzima é a produtividade da enzima, que é medida pela quantidade do produto por unidade de enzima (g óleo produzido/g enzima), durante a primeira meia vida. Meias vidas de lipase típicas em reações de interesterificação são sete dias. Ver, por exemplo, Huang, Fang-Cheng and Ju, Yi-Hsu, "Interesterification of palm midfraction and stearic acid with *Rhizopus arrhizus* lipase immobilized on polypropylene", *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 28(2): 73-78 (1997); Van der Padt, A. et al., "Synthesis of triacylglycerols. The crucial role of water activity control", *Progress in Biotechnology*, 8 (Biocatalysis in Non-Conventional Media): 557-62 (1992). Meias vidas variam muito dependendo das lipases entre si.

[007] Entretanto, meias vidas também variam dependendo da qualidade dos substratos. Quando biocatalisadores, tais como enzimas, são usados componentes na mistura do substrato podem diminuir o tempo de vida efetivo do catalisador. Em operações contínuas, a razão de substrato processado na enzima é muito alta, dessa maneira, componentes menores de óleo podem ter um

efeito deletério cumulativo na atividade da enzima. Diversos compostos de oxidação em óleo, tais como hidroperóxidos e produtos de oxidação secundários (por exemplo, aldeídos ou cetonas), podem causar inativação significativa de lipase em óleos. Ver, por exemplo, Pirozzi, Domenico, "Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides", *European Journal of Lipid Science and Technology* 105(10): 608-613 (2003); Gray, Jr. L, "Measurement of Lipid Oxidation: A Review", *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 55: 539-546 (1978); Patent U.S. Application Publication No. 200510014237 A1, e publications cited therein. Produtos de oxidação incluem espécie oxidativa que inicia caminhos da reação radical auto propagados, ou outra espécie de oxigênio reativa (tais como peróxidos, ozônio, superóxido, etc.). Estes e outros constituintes que causam ou aparecem da degradação de gordura ou óleo podem resultar em degradação de enzima. A presença de água e outras substâncias também pode influenciar fortemente a atividade de lipases usada na transesterificação. Ver, por exemplo, Jung, H. J. And Bauer, W., "Determination of process parameters and modeling of lipase-catalyzed transesterification in a fixed bed reactor", *Chemical Engineering & Technology*, 15(5): 341-8 (1992). Alguns íons metálicos (Mg²⁺ e Fe²⁺) têm também sido citados como inibidores para algumas lipases. Entretanto, os processos e fatores causadores pelos quais lipases tornam-se inativas não são completamente entendidos.

[008] Observou-se que usando diferentes lotes da mesma matéria prima em um catalisado por lipase óleo deu amplas va-

riações em meia vida de lipase. Diks, Rob M. M., "Lipase stability in oil", *Lipid Technology*, 14(1): 10-14 (2002). Nenhum relacionamento foi encontrado entre meia vida de lipase e o PV do óleo ou o valor para-anisidina (PAV). Além do mais, nenhuma correlação entre os níveis metálicos (Fe e Cu), glicérides polimerizados, ou fosfolipídios e meia vida de lipase poderiam ser estabilizados.

[009] Uma investigação a respeito da causa de perda de atividade de lipase imobilizada na acidólise de óleo de girassol alto oléico com ácido esteárico determinou que produtos de oxidação aumentaram a taxa de desativação, mas a remoção de produtos de oxidação a partir de óleos impediu a perda da atividade. Nezu, T. et al., "The effect of lipids oxidation on the activity of interesterification of triglyceride by immobilized lipase", in *Dev. Food Eng.*, 6th Proc. Int. Congr. Eng. Food, 591-3 (Yano, T. et al., eds., Blackie, Glasgow, 1994). Lipases imobilizadas incubadas com 2-aldeídos insaturados (tipicamente formados como produtos de oxidação secundários na quebra oxidativa de óleos) perdem sua atividade catalítica. Hidroperóxidos de ácido linoléico a níveis de PV >5 meq/kg causam perda de atividade da lipase, e o taxa de inativação de enzima aumenta à medida que PV aumenta; o mecanismo de inativação de enzima foi a geração de radicais livres na enzima como os peróxidos decompostos. Wang, Y. And Gordon, M. H., "Effect of lipid products of oxidation on the transesterification activity of the immobilized lipase", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(9): 1693-5 (1991). Quando lipídios oxidados foram separados de uma amostra de

óleo de palmeira e fracionados, eles demonstraram que frações exibindo altos graus de inativação poderiam ser isoladas, mas os compostos inibidores não foram identificados. *Id.*

[010] É comum a atividade rápida da lipase diminuir durante reações catalisadas de lipase contínuas. *Ver, por exemplo, Ferreira-Dias, S. et al. "Recovery of the activity of an immobilized lipase after its use in fat transesterification", Progress in Biotechnology, 15 (Stability and Stabilization of Biocatalysis): 435-440 (1998); Diks, Rob M. M., "Lipase stability in oil", Lipid Technology, 14(1):10-14 (2002).*

[011] Diversos métodos foram testados para eliminar perda de atividade ou recuperar a atividade de lipase inativada.

a) Recuperação de atividade da lipase perdida nas reações de transesterificação foi realizada lavando a preparação da lipase com hexano e ajustando a atividade da água da preparação até 0,22. *Ferreira Dias, S. et al. "Recovery of the activity of an immobilized lipase after its use in fat transesterification", Progress in Biotechnology, 15 (Stability and Stabilization of Biocatalysis): 435-440 (1998).* Embora o mecanismo seja desconhecido, este tipo de recuperação da atividade é consistente com a perda da atividade causada por acúmulo de compostos inibidores, tais como produtos de oxidação de lipídio. *Id.*

b) Redução da atividade da água de um substrato de transesterificação (óleo de palmeira bruto/ óleo de semente de colza degomado) de 280 ppm para 60 ppm foi acompanhada por um aumento de meia vida de lipase imobilizada de 10 horas até 100 horas. *Huang, Fang-Cheng and Ju, Yi-Hsu, "Interesterifi-*

cation of palm midfraction and stearic acid with *Rhizopus arrhizus* lipase immobilized on polypropylene", *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 28(2):73-78 (1997).

c) Meia vida de lipase foi aumentada immobilizando certas composições com lipase. Por exemplo, a meia vida de lipase immobilizada em sílica de poro controlado aumentou cinco vezes quando PEG-1500 foi co-immobilizada com a lipase. Soares, C. M. F. et al., "Selection of stabilizing additive for lipase immobilization on controlled pore silica by factorial design", *Applied Biochemistry e Biotechnology*, 91-93(Symposium on Biotechnology for Fuels and Products chemicals, 2000):703-718 (2001).

d) JP 11-103884 descreve que a adição de pequenas quantidades (0,01 - 5% em peso) de fosfolipídios a uma lipase *Alcaligenes* immobilizada causou um aumento dez vezes em meia vida de lipase.

e) Outros têm meia vida de lipase prolongada por meio de pré-tratamento do óleo do substrato. JP 08-140689 A2 descreve o uso de resina de troca iônica Duolite A-7 para tratar uma mistura de óleo de palmeira com estearato de etila antes da interesterificação usando uma lipase *Rhizopus* immobilizada para aumentar a meia vida de 3 dias até 8 dias. Duolite A-7 é uma resina de troca iônica contendo grupos amino. JP 08-140689 A2 também descreve pré-tratamento de óleos do substrato com proteínas ou peptídeos contendo um grande número de resíduos de aminoácido básicos tais como histona, protainina, lisossomo ou polilisina. JP 08-140689 A2 estabelece que grupos amino reagem com aldeídos ou cetonas (produtos de

oxidação secundários) para formar uma base de Schiff; e que tais produtos de oxidação secundários são um fator na inativação de lipase.

f) JP 02-203789 A2 descreve extensão da meia vida de lipase imobilizada por pré-tratamento do substrato com uma substância alcalina. Quando uma mistura igual de óleo de semente de colza e óleo de palmeira foi interesterificada em uma coluna de lipase imobilizada em Celite 535, a meia vida da lipase foi 18 horas. Quando o substrato foi misturado com uma solução de hidróxido de potássio (substrato 5 mL/kg) a meia vida da atividade da enzima foi 96 horas. Uma abordagem alternativa é para tratar celite com hidróxido de sódio e misturar isto na mesma mistura de substrato. Usando esta abordagem, meia vida de lipase foi estendida até 33 horas. JP 02 203790 M.

g) Demonstrou-se que, Novozima 435 é mais afetada por produtos de oxidação secundários que por hidroperóxidos (Pirozzi, Domenico, "Improvement of lipase stability in the presence of commercial triglycerides", *European Journal of Lipid Science and Technology* 105(10):608-613 (2003)). Com esta lipase, mostrou-se que grupos sulfidrila de lipase interagem com dois aldeídos do produto de oxidação secundários, 4-hidroxinonenal (4-HNE) e malondialdeído (MDA). Neutralizando 4-HNE e MDA em óleo com albumina, a estabilidade da enzima foi aumentada.

h) Pedido de patente U.S. No, 2003/0054509 descreve o uso de meio de purificação não modificado (por exemplo, sílica gel) para aumentar meia vida enzimática. Pedido de pa-

tente U.S. No. 2005/0014237 descreve o uso de processos de desodorização para aumentar meia vida enzimática.

[012] Consequentemente, existe uma antiga necessidade na técnica de catálise enzimática para soluções desta perda de atividade. Ver também Diks, Rob M. M., "Lipase stability in oil", *Lipid Technology*, 14(1):10-14 (2002); Wang, Y. And Gordon, M. H., "Effect pf lipid products of oxidatin on the transesterification activity of the immobilized lipase", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(9):1693-5 (1991). O período de tempo sob o qual lipase retém sua atividade enzimática é uma importante consideração de custo na interesterificação catalisada por lipase. A perda de atividade efetiva da enzima é prejudicial ao processo industrial por causa do custo de substituir enzima e tempo de produção necessário para trocar enzimas, trocar colunas, e estabilizar uma nova coluna. Assim, a extensão de meia vida da enzima é extremamente crítica para o sucesso da comercialização de interesterificação enzimática. Esta necessidade antiga é uma barreira primária para a expansão de reações catalisadas por enzima para produção de bens de consumo ou produtos químicos "em massa".

[013] Embora mais dos mecanismos de inativação de lipase e sua prevenção sejam pouco entendidos atualmente, a presente abordagem descreve uma solução efetiva para prevenir degradação de lipase e aumentar sua produtividade e meia vida.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[014] Modalidades da invenção são direcionadas a vários métodos para produzir gorduras ou óleos, fazendo contato com

um substrato inicial compreendendo um ou mais glicerídeos com um ou mais tipos de meio de purificação para gerar um substrato purificado, e fazer contato com o substrato purificado com lipase para efetuar esterificação, interesterificação ou transesterificação criando as gorduras ou óleos. Nas várias modalidades da invenção, o meio ou meios de purificação pode ser um ou mais de aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos ou proteínas. Os aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos, ou proteínas podem ser revestidos em um veículo de suporte, formando dessa maneira um meio ou meios de purificação usados nos métodos da invenção.

[015] Em uma modalidade da invenção, proteína vegetal é usada como um meio de purificação. Assim, uma modalidade da invenção é direcionada a um método para produzir gorduras ou óleos compreendendo: (a) fazer contato com um substrato inicial compreendendo um ou mais glicerídeos com um ou mais tipos de proteína vegetal para gerar um substrato purificado; e (b) fazer contato com o substrato purificado com lipase para efetuar esterificação, interesterificação ou transesterificação criando as gorduras ou óleos. Em várias modalidades da invenção, a proteína vegetal pode ser uma proteína de soja, ou uma proteína vegetal texturizada tais como uma proteína de soja texturizada.

[016] Em uma outra modalidade da invenção, um ou mais dos ácidos são revestidos em um ou mais tipos de meio de purificação. Assim, uma modalidade da invenção é direcionada a um método para produzir gorduras ou óleos compreendendo: (a) fazer contato com o substrato inicial compreendendo um ou mais

glicerídeos com um ou mais tipos de meio de purificação para gerar um substrato purificado; e (b) fazer contato com o substrato purificado com lipase para efetuar esterificação, interesterificação ou transesterificação criando as gorduras ou óleos; em que um ou mais dos ácidos são revestidos em um ou mais tipos de meio de purificação. Em várias modalidades da invenção, um ou mais aminoácidos pode ser qualquer um de arginina, lisina, histidina e/ou cisteína.

[017] Ainda em uma outra modalidade da invenção, um ou mais peptídeos, polipeptídeos e/ou proteínas ("material de proteína") são revestidos em um ou mais tipos de meio de purificação. Assim, uma modalidade da invenção é direcionada a um método para produzir gorduras ou óleos compreendendo: (a) fazer contato com um substrato inicial compreendendo um ou mais glicerídeos com um ou mais tipos de meio de purificação para gerar um substrato purificado; e (b) fazer contato com o substrato purificado com lipase para efetuar esterificação, interesterificação ou transesterificação criando as gorduras ou óleos; em que um ou mais peptídeos, polipeptídeos, ou proteínas (um ou mais "materiais de proteína") são revestidos em um ou mais tipos de meio de purificação. A meia vida da atividade enzimática da lipase pode ser mais que cerca de 2,5 vezes maior que a meia vida da atividade enzimática resultante do contato com a lipase com o substrato inicial.

[018] Ainda em uma outra modalidade, a invenção é direcionada ao uso de uma proteína como um meio de purificação. Assim, uma modalidade da invenção é direcionada a um método para produzir gorduras ou óleos compreendendo: (a) fazer conta-

to com um substrato inicial compreendendo um ou mais glicerídeos com um ou mais proteínas para gerar um substrato purificado; e (b) fazer contato com o substrato purificado com lipase para efetuar esterificação, interesterificação ou transesterificação criando as gorduras ou óleos. A meia vida da atividade enzimática da lipase pode ser mais que cerca de 2,5 vezes maior que a meia vida da atividade enzimática resultante do contato com a lipase com o substrato inicial.

[019] Ainda em uma outra modalidade, a invenção é direcionada ao uso de uma proteína texturizada como um meio de purificação. Assim, uma modalidade da invenção é direcionada a um método para produzir gorduras ou óleos compreendendo: (a) fazer contato com um substrato inicial compreendendo um ou mais glicerídeos com um ou mais tipos de proteína texturizada para gerar um substrato purificado; e (b) fazer contato com o substrato purificado com lipase para efetuar esterificação, interesterificação ou transesterificação criando as gorduras ou óleos.

[020] Em várias modalidades da invenção, os métodos para produzir as gorduras ou óleos também podem incluir (c) monitorar atividade enzimática medindo uma ou mais propriedades físicas das gorduras ou óleos após fazer contato com a lipase; (d) ajustar o tempo de duração para que o substrato purificado faça contato com a lipase, ou ajustar a temperatura do substrato inicial, o substrato purificado; um ou mais tipos de meio de purificação ou a lipase em resposta a uma mudança na atividade enzimática para produzir gorduras ou óleos tendo uma maior proporção substancialmente uniforme de este-

rificação, interesterificação, ou transesterificação com relação ao substrato inicial; e/ou (e) ajustar a quantidade e tipo de um ou mais tipos de meio de purificação em resposta a mudanças nas propriedades físicas das gorduras ou óleos para aumentar produtividade enzimática do lipase. Uma ou mais propriedades físicas podem incluir a temperatura do ponto de gotejamento Mettler das gorduras ou óleos e/ou o perfil do teor de gordura sólida das gorduras ou óleos.

[021] Nos métodos inventivos, o substrato inicial pode também incluir qualquer dos ácidos livres de gordura, álcoois monoidroxílicos, álcoois polioidroxílicos, ésteres e suas combinações.

[022] Um ou mais glicerídeos usados nos métodos inventivos pode ser qualquer um de i) gordura de manteiga, manteiga de cacau, substitutos de manteiga de cacau, gordura de ilipê, manteiga de kokum, gordura de leite, gordura *mowrah*, manteiga *phulwara*, gordura de sal, manteiga de karité, sebo de bornéu, banha de porco, lanolina, gordura de boi, gordura de carneiro, gordura de vela, gordura animal, óleo de canola, óleo de rícino, óleo de coco, óleo de coentro, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de avelã, óleo de cânhamo, óleo de pinho manso (*jatropha*), óleo de semente de linho, óleo de semente de manga, óleo de limnanto (*meadowfoam*), óleo de mostarda, óleo de mocotó, óleo de oliva, óleo de palmeira, óleo de palmiste, óleo de amendoim, óleo de semente de colza, óleo de farelo de arroz, óleo de açafroa, óleo de sasanqua, manteiga de karité, óleo de soja, óleo de semente de girassol, óleo de pinho, óleo de tsubaki, óleos vegetais, óleos mari-

nhos que podem ser convertidos em gorduras plásticas, óleos marinhos que podem ser convertidos em gorduras sólidas, óleo de peixe, óleo de peixe-carvão do Pacífico, óleo de fígado de bacalhau, óleo de peixe olho-de-vidro laranja, óleo *pileherd*, óleo de sardinha, óleos de baleia, óleos de arenque, 1,3-dipalmitoil-2-monooleína (POP), 1(3) palmitoil-3(1)-estearoil-2-monooleína (POSt), 1,3-diestearoil-2-monooleína (StOSt), triglicerídeo, diglicerídeo, monoglicerídeo, triglicerídeo do ácido beênico, trioieína, tripalmitina, tristearina, óleo de palmeira, estearina de palmeira, óleo de palmiste, estearina de semente de palmeira, glicerídeos de ácidos graxos de cadeia média; ou suas combinações ii) óleos parcialmente hidrogenados processados de (i); iii) óleos totalmente hidrogenados processados de (i); ou iv) óleos fracionados de (i).

[023] O substrato inicial usado nos métodos inventivos pode também incluir ésteres. Os ésteres podem ser qualquer dos ésteres de cera, ésteres de alquila, ésteres de metila, ésteres de etila, ésteres de isopropila, ésteres de octadecila, ésteres de arila, ésteres de propileno glicol, ésteres de etileno glicol, ésteres de 1,2-propanodiol, ésteres de 1,3-propanodiol, e suas combinações. Os ésteres podem ser formados a partir da esterificação ou transesterificação de álcoois monoidroxílicos ou álcoois polioidroxílicos. Os álcoois monoidroxílicos ou os álcoois polioidroxílicos podem ser compostos de álcoois primários, secundários ou terciários de cadeia anular, reta ou ramificada. Os álcoois monoidroxílicos pode ser qualquer um de álcool metílico, álcool isopropílico,

álcool alílico, etanol, propanol, n-butanol, iso-butanol, sec-butanol, terc-butanol, n-pentanol, iso-pentanol, n-hexanol ou álcool octadecílico. Os álcoois poliidroxicos podem ser qualquer um de glicerol, propileno glicol, etileno glicol, 1,2-propanodiol ou 1,3-propanodiol.

[024] O substrato inicial usado nos métodos inventivos pode também ter álcoois monoidroxílicos primários, secundários ou terciários de compostos de cadeia anular, reta ou ramificada. Os álcoois monoidroxílicos podem ser qualquer um de álcool metílico, álcool isopropílico, álcool alílico, etanol, propanol, n-butanol, iso-butanol, sec-butanol, terc-butanol, n-pentanol, iso-pentanol, n-hexanol ou álcool octadecílico.

[025] O substrato inicial usado nos métodos inventivos pode também ter álcoois poliidroxicos primários, secundários ou terciários de compostos de cadeia anular, reta ou ramificada. Os álcoois poliidroxicos podem ser qualquer um de glicerol, propileno glicol, etileno glicol, 1,2 propanodiol ou 1,3-propanodiol.

[026] O substrato inicial usado nos métodos inventivos pode também ter um ou mais ácidos graxos que são saturados, insaturados ou poli-insaturados. Um ou mais ácidos graxos podem ter cadeias de carbono de cerca de 4 a cerca de 22 carbonos de comprimento. Os ácidos graxos podem ser qualquer um de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linilênico, ácido araquidônico, ácido erúrico, ácido capríco, ácido caprílico, ácido cáprico ácido láurico, ácido mirístico, ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docos-

saexaenóico(DHA), ácido 5-eicossenóico, ácido butírico, ácido γ -linolênico ou ácido linoléico conjugado.

[027] Em modalidades usando os métodos inventivos, um ou mais tipos de meio de purificação na lipase são empacotados em uma ou mais colunas. As colunas podem ser colunas encamisadas nas quais a temperatura do substrato inicial, o substrato purificado, um ou mais tipos de meio de purificação ou a lipase é regulada.

[028] Em outras modalidades usando os métodos inventivos, o substrato purificado pode ser preparado misturando o substrato inicial com um ou mais tipos de meio de purificação em um tanque para uma reação de purificação de lama em lotes ou misturando o substrato inicial em uma série de tanques para uma série de reações de purificação de lama em lotes. O substrato purificado pode ser separado a partir de um ou mais tipos de meio de purificação por meio de filtração, centrifugação ou concentração antes de reagir o substrato purificado com a lipase. O substrato purificado pode então ser misturado com a lipase em um tanque para uma reação de lama em lotes, ou escoando o substrato purificado através de uma coluna contendo a lipase.

[029] Ainda em outras modalidades dos métodos da invenção, um leito de um ou mais tipos de meio de purificação é colocado sob um leito da lipase dentro de uma coluna. A coluna pode ser uma coluna encamisada na qual a temperatura do substrato inicial, o substrato purificado, um ou mais tipos de meio de purificação ou a lipase é regulada.

[030] A lipase usada nos métodos da invenção pode ser ob-

tida de uma linha celular eucariótica ou procariótica cultivada. A lipase pode ser uma lipase 1,3-seletiva ou uma lipase não seletiva. As gorduras ou óleos produzidos podem ser 1,3-diglicerídeos.

[031] Em modalidades da invenção, um ou mais glicerídeos usados nos métodos da invenção podem ser parcialmente óleo de soja hidrogenado, óleo de milho parcialmente hidrogenado, óleo de semente de algodão parcialmente hidrogenado, óleo de soja totalmente hidrogenado, óleo de milho totalmente hidrogenado, e/ou óleo de semente de algodão totalmente hidrogenado.

[032] Em outras modalidades da invenção, um ou mais glicerídeos usados nos métodos da invenção podem ser óleo de palmeira parcialmente hidrogenado, óleo de palmiste parcialmente hidrogenado, óleo de palmeira totalmente hidrogenado, óleo de palmiste totalmente hidrogenados, fracionados óleo de palmeira, óleo de palmiste fracionado, óleo de palmeira parcialmente hidrogenado fracionado, e/ou óleo de palmiste fracionado parcialmente hidrogenado.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DAS FIGURAS

[033] Figura 1 mostra o ajuste da taxa de bombeamento em função do tempo de corrida para lipase exposta a substrato não tratado (círculos abertos), substrato tratado com arginina granular (círculos fechados), ou substrato tratado com sílica revestida com arginina (losangos fechados).

[034] Figura 2 mostra o ajuste da taxa de bombeamento em função do tempo de corrida para lipase exposta a substrato tratado com sílica revestido com arginina (losangos fechados), sílica revestida com lisina (círculos abertos), sílica

revestida com histidina (triângulos fechados), e sílica revestida com cisteína (estrelas "*").

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[035] A presente abordagem diz respeito ao aumento da produtividade ou meia vida enzimática de enzimas que catalisam esterificação, interesterificação ou transesterificação. De maneira particular, a presente abordagem diz respeito à remoção de um substrato inicial de constituintes que causam degradação da lipase. Tais constituintes podem causar ou aparecer da degradação de gordura ou óleo, do tratamento ou processamento do substrato, ou a partir de outras causas. Tais constituintes podem ser removidos pelo tratamento do substrato inicial com um meio de purificação antes de fazer contato com a lipase. O meio de purificação pode ser um ou mais aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos ou proteínas, que são mantidos separados a partir de enzima. Os aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos ou proteínas podem ser revestidos em um veículo de suporte sólido por meio de absorção, adsorção, ligações covalentes, ligações iônicas ou ligações de hidrogênio.

[036] Tratamento de substratos com aminoácidos é vantajoso sob o uso de substâncias contendo grupo amino convencionais, tais como os descritos em JP 08-140689 A2. A vantagem de usar aminoácidos é por causa da maior liberdade estérica de aminoácidos livres. Grupos amino de substâncias contendo grupo amino convencionais são ligados e menos facilmente disponíveis para reagir com produtos de oxidação secundários.

[037] A presente abordagem também diz respeito a testar

aminoácidos por sua capacidade para serem usados para purificar substrato inicial e aumentar a meia vida de enzimas. Um aminoácido que é crucial para a inativação de uma enzima pode ser especificamente selecionado por experimentos para a proteção de uma enzima. Por exemplo, cisteína pode ser usada para a enzima cuja inativação está relacionada com a oxidação do grupo sulfidrila.

[038] Acredita-se que a desnaturação das cadeias laterais de enzimas, especialmente nos sítios ativos, seja uma causa da perda de atividade da enzima. A desnaturação pode ser causada por reações entre as cadeias laterais de aminoácido nas constituintes de impureza da enzima e substrato que causam degradação de enzima. Entretanto, diferentes enzimas têm diferentes cadeias laterais de aminoácido envolvidas em desnaturação de enzima. Conseqüentemente, a presente abordagem contempla classificação de aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos ou proteínas por sua capacidade de reagir com constituintes de impureza do substrato isolados e conseqüentemente serve como um meio de purificação do substrato inicial para aumentar meia vida enzimática. Tal classificação pode também ser feita com substrato inicial que contém os constituintes de impureza do substrato. Alternativamente, a presente abordagem contempla usar aminoácidos ou peptídeos ou polipeptídeos para purificação do substrato inicial onde sabe-se que um ou mais resíduos de aminoácido particulares são propensos a reagir com impurezas do substrato onde as reações resultam em enzima de inativação. Assim, aminoácidos, peptídeos ou polipeptídeos podem ter um efeito protetor para enzimas funcio-

nando como uma "armadilha" para reagir e remover compostos de inativação nos substratos, impedir as enzimas de serem desnaturadas pelos compostos. Aprisionamento dos compostos de inativação pode também fornecer um meio para concentrar os compostos de inativação para recuperação e uso, tal como o uso como inativadores de enzima seletivos.

[039] Aminoácidos consistem em um grupo amino e um grupo carboxila, ambos ligados a um átomo de carbono, que é chamado carbono alfa. O carbono alfa é tipicamente adicionalmente ligado a um hidrogênio e um grupo R, referido como uma cadeia lateral. Entretanto, o carbono alfa pode também ser ligado a dois grupos R. Cadeias laterais variam de tamanho, forma, carga, capacidade de ligação de hidrogênio e reatividade química. Cadeias laterais podem ser apolar, polar, carregadas ou não carregadas. Alguns aminoácidos têm cadeias laterais básicas com mais que um grupo amino. Exemplos de tais aminoácidos incluem lisina, arginina e histidina. Asparagina e glutamina têm cadeias laterais amida. Cisteína e metionina têm cadeia lateral contendo enxofre. O grupo amino (ligado ao carbono alfa, ou parte da cadeia lateral do grupo R) pode ser um grupo amino primário, secundário ou terciário. Qualquer aminoácido pode ser usado de acordo com a presente abordagem, incluindo aminoácidos artificiais e isoméricos.

[040] Exceto para o uso no contexto de um resíduo que é parte de um peptídeo, polipeptídeo ou proteína, "aminoácido" da maneira aqui usada refere-se a um aminoácido não ligado a outros aminoácidos por meio de uma ligação de peptídeo (ou, por meio de uma ligação de amida). Exceto para o uso no con-

texto de resíduos que são parte de um peptídeo, polipeptídeo ou proteína, "um ou mais aminoácidos" da maneira aqui usada refere-se a um ou mais tipos de aminoácidos, em que os aminoácidos não são ligados um ao outro por meio de uma ligação de peptídeo (ou, por meio de uma ligação de amida). Peptídeos, polipeptídeos e proteínas todos contêm mais que um aminoácido covalentemente ligado um ao outro através de ligação de amidas ($-\text{NH}-\text{C}(\text{O})\text{CHR}$, onde R é o grupo R ligado ao carbono alfa). Peptídeos e polipeptídeos podem ser compreendidos dos mesmos ou diferentes tipos de resíduos de aminoácido (isto é, aminoácidos tendo os mesmos ou diferentes tipos de grupos R anexados ao carbono alfa).

[041] Exemplos não limitantes de aminoácidos usados de acordo com o presente incluem alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptofano, metionina, glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutâmico, lisina, arginina, histidina, ácido 2-aminoadiíco, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido 6-aminocapróico, ácido 2-aminoeptanóico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiônico, N-etilglicina, N-etilasparagina, hidroxilisina, alohidroxilisina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, aloisoleucina, N-metilglicina, N-metilisoleucina, 6-N-metilisina, N-metilvalina; norvalina, norleucina, e omitina. Aminoácidos podem ser do esteroisômero levulorotário conven-

cional, ou do esteroisômero dextrorotário. Em uma modalidade preferida, o aminoácido é arginina, lisina, histidina ou cisteína.

[042] Da forma aqui usada, o termo "material de proteína" é aqui usado para referir-se a e englobar peptídeos, polipeptídeos e proteínas. Por exemplo, entende-se que o termo "um ou mais materiais de proteína" seja para referir-se a um ou mais peptídeos, polipeptídeos e/ou proteínas.

[043] Um outro aspecto da presente abordagem é aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos ou proteínas revestidos em veículos de suporte para aumentar o contato da área da superfície. Aminoácidos não são solúveis em óleo e não podem ser bem dispersos no substrato do óleo para reação com as impurezas de inativação no óleo do substrato. Aminoácidos não são qualquer material poroso. Grande área da superfície é benéfica para um contato eficiente entre os aminoácidos e impurezas. Uma outra vantagem de usar veículos de suporte é o custo. Veículos de suporte são normalmente mais baratos que aminoácidos. Da forma aqui usada, "revestido" refere-se a um revestimento que resulta de mistura, adsorção, absorção, ligação covalente, ligação de hidrogênio ou associação iônica de aminoácidos, peptídeos, polipeptídeos ou proteínas aos veículos de suporte.

[044] Exemplos não limitantes de veículos de suporte sólidos incluem carbono ativado, carbono ativado de pedra, carbono ativado de madeira, carbono ativado de turfa, carbono ativado de casca de coco, minerais naturais, minerais processados, montmorilonita, atapulgita, bentonita, paligorsquita,

terra de Fuller, diatomita, esmectita, hormita, areia de quartzo, limestona, caulim, argila de bola, talco, pirofilita, perlita, sílica, silicato de sódio, sílica hidrogel, sílica gel, sílica pirogênica, sílica precipitada, sílica coloidal, sílica dialítica, materiais fibrosos, celulose, ésteres de celulose, éteres de celulose, celulose microcristalina; alumina, zeolita, amidos, peneiras moleculares, lipase imobilizada previamente usada, terra diatomácea, resina de troca iônica, resina de cromatografia exclusão de tamanho, resinas quelantes, resinas quirais, cinza de casca de arroz, sílica de fase reversa, e argilas de lixiviação. O meio de purificação pode ser resinoso, granulado, particulado, membranoso ou fibroso.

[045] Preferivelmente, o suporte sólido é relativamente barato e tem uma grande área da superfície. Exemplos não limitantes de tais suportes incluem carbonos ativados, minerais naturais (tais como argilas), minerais processados (tais como argilas ativadas por ácido), diatomita, caulim, talo, perlita, vários produtos de sílica, alumina, zeolita, amidos, peneiras moleculares, areia de quartzo, limestona, materiais fibrosos (tais como celulose, ou celulose microcristalina), terra diatomácea, cinza de casca de arroz e resinas de troca iônica.

[046] A presente abordagem também diz respeito ao uso de proteína como um meio de purificação do substrato. A proteína pode ser proteína vegetal (por exemplo, proteína de soja), proteína vegetal texturizada (por exemplo, proteína de soja texturizada) e/ou outras proteínas, tal como proteína de so-

ro. Em particular, a presente abordagem é direcionada ao uso de uma proteína como essa para purificar o substrato inicial antes de fazer contato do substrato com lipase. Em uma modalidade da presente abordagem, proteína vegetal texturizada é usada. Proteína vegetal texturizada tem uma textura rígida e uma estrutura aberta expandida, que fornece maior área da superfície para interagir com óleo, conferindo assim vantagens substanciais sob proteína convencional no seu uso para tratamento de óleo.

[047] Ao contrário, grupos amino em peptídeos convencionais ou proteínas (tais como os descritos em JP 08-140689 A2) são ligados e não facilmente disponíveis para reagir com produtos de oxidação secundários. Em uma matriz não aquosa, forças iônicas mantêm proteínas agrupadas tendem a ser pelo menos uma ordem de grandeza maior que outras forças (por exemplo, interações Van der Waals ou ligação de hidrogênio). Proteínas convencionais em uma matriz não aquosa tende a se agrupar e apresentar a menor área total da superficial possível ao meio não aquoso. Assim, proteínas convencionais minimizam os grupos amino disponíveis para interação com os componentes dos óleos que são considerados causadores de inativação da enzima. Conseqüentemente, aminoácidos de proteínas convencionais são relativamente impenetráveis (e não disponíveis) em óleos e outro meio não aquoso, e não reagem tão facilmente com os componentes do óleo considerados causar a inativação da enzima.

[048] As proteínas usadas de acordo com a presente abordagem fornecem vantagens sobre proteínas convencionais. De

acordo com uma modalidade da presente abordagem, proteína vegetal texturizada da marca TVP® disponível de Archer-Daniels-Midland Company of Decatur, Illinois é usada. O teor de umidade deste produto é tipicamente cerca de 6%. Vantagens conferidas pelo processo de texturização incluem rigidez da partícula e aumento na área da superfície com relação à proteína não texturizada. Outros tratamentos tais como expansores de fava de soja típica e dispositivos de formação de coleta também podem ser usados para conferir propriedades desejadas na proteína.

[049] Um bom contato entre o substrato inicial e um meio de purificação do substrato da proteína pode ser facilitado usando uma proteína que é relativamente seca. Assim, em uma modalidade, o teor de umidade da proteína (por exemplo, uma proteína vegetal ou uma proteína vegetal texturizada) é menor que cerca de 5%. Por exemplo, o teor de umidade da proteína pode ser de cerca de 0% a cerca de 5%, ou qualquer quantidade entre cerca de 0% e cerca de 5% (por exemplo, cerca de 0%, cerca de 1%, cerca de 2%, cerca de 3%, cerca de 4%, ou cerca de 5%), ou qualquer faixa entre cerca de 0% e cerca de 5% (por exemplo, cerca de 2% a cerca de 4%).

[050] A faixa de umidade da proteína (por exemplo, uma proteína vegetal ou uma proteína vegetal texturizada) pode ser controlada durante fabricação para dar o teor de umidade desejado. Alternativamente, o teor de umidade da proteína pode ser ajustado após fabricação, por exemplo, por forno de secagem ou contato com um solvente que remove alguma da umidade da proteína vegetal texturizada. Umidade pode ser remo-

vida por outros métodos conhecidos, tal como lavando com solventes anidros. Por exemplo, o teor de umidade de proteína vegetal texturizada contendo 6% de umidade pode ser reduzido lavando com etanol anidro. Proteína vegetal texturizada lavada com etanol pode ser rinsada com um solvente que tem boa miscibilidade com triacilgliceróis, tais como acetona, acetato de etila ou hexano.

[051] A composição típica da fava de soja é cerca de 18% de óleo, cerca de 38% de proteína, cerca de 15% de carboidrato insolúvel (fibra dietética), cerca de 15% de carboidrato solúveis (sacarose, estaquiose, rafinose, outros) e cerca de 14% de umidade, cinza e outros. *Ver, por exemplo, Egbert, W. R., "Isolated soy protein: Technology, properties, and applications", in soybeans as Functional Foods and Ingredients, 134-163 (KeShun L., ed., AOCs Press, Champaign, IL 2004).* Proteína de soja texturizada é feita primeiramente trincando as favas de soja para remover a casca e laminando as favas em flocos totalmente gordurosos. O processo de laminação rompe a célula do óleo, facilitando a extração do solvente do óleo. Após o óleo ser extraído, o solvente é removido e os flocos são secos, criando flocos de soja desengordurados. Os flocos desengordurados podem em seguida ser moído para produzir farinha de soja, dimensionada para produzir grãos de soja ou texturizada para produzir proteína de soja texturizada tal como proteína vegetal texturizada da marca TVP® Archer-Daniels-Midland Company's. Os flocos desengordurados podem ser adicionalmente processados para produzir concentrados de proteína de soja e proteína de soja isolada. Isto é acompa-

nhado pela remoção dos componentes de carboidrato de fava de soja seguido pela secagem.

[052] Proteínas de soja são geralmente classificados em três grupos: farinha de sojas, concentrados de proteína de soja e proteínas de soja isoladas com teores proteína mínimos de cerca de 50%, cerca de 65% e cerca de 90% (base seca), respectivamente. Farinhas de soja são vendidas tanto como pós finos quanto grãos com um tamanho de partícula variando de - 0,2 a 5 mm. Esses produtos podem ser fabricados usando aquecimento mínimo para manter a atividade da enzima inerente da soja, ou ligeiramente a altamente torrados para reduzir ou eliminar a enzimas ativas. Farinhas de soja e grãos foram tradicionalmente usados como um ingrediente na indústria de padaria.

[053] Concentrados de proteína de soja são tradicionalmente fabricados usando álcool aquoso para remover os açúcares solúveis a partir de flocos de soja desengordurados (farinha de soja). Este processo resulta em uma proteína com baixa solubilidade e um produto que pode absorver água, mas não tem a capacidade para gelificar ou emulsificar a gordura.

[054] Concentrados lavados de álcool tradicional são usados para fortificação de proteína de alimentos bem como na fabricação de concentrados de proteína de soja texturizada. Concentrados de proteína de soja funcionais ligam água, emulsificantes de gordura e formam um gel mediante aquecimento. Concentrados de proteína de soja funcionais podem ser produzidos de concentrado lavado de álcool usando aquecimento e homogeneização seguido por secagem por aspersão; ou produzi-

dos usando um processo de lavagem com água a um pH ácido para remover os açúcares solúveis seguido por neutralização, processo térmico, homogeneização e secagem por aspersão. Concentrados de proteína de soja funcionais são amplamente usados na indústria de carne para ligar água e emulsificar gordura. Estas proteínas também são efetivas em estabilizar molhos e sopas altamente gordurosos.

[055] Proteínas de soja texturizadas ou estruturadas podem ser feitas de farinha de soja, concentrado de proteína de soja ou proteína de soja isolada. Proteína vegetal texturizada da marca TVP® é fabricada através de extrusão termoplástica de farinha de soja sob calor úmido e alta pressão. Versados na técnica são familiarizados com as variedades de proteína vegetal texturizada. Concentrado de proteína de soja texturizada é produzido de pós concentrados de proteína de soja usando tecnologia de fabricação similar a proteína vegetal texturizada da marca TVP® da Archer-Daniels-Midland Company. Produtos de proteína texturizada únicos podem ser produzidos usando combinações de proteína de soja ou outros ingredientes de proteína pulverizados tal como glúten de trigo em combinação com várias fontes de carboidrato (por exemplo, amidos). Versados na técnica são familiarizados com os produtos texturizados fabricados pela tecnologia de extrusão termoplástica. Tais produtos são distribuídos por todo o mundo na forma seca. Estes produtos são hidratados em água ou soluções flavorizadas antes do uso em produtos de carne processados, vegetarianos análogos ou usados sozinhos em outros produtos alimentícios acabados para simular carne. Tecnologia de fibra

formada por extrusão contínua pode ser usada para produzir uma proteína texturizada fibrosa de proteína de soja isolada com uma estrutura que se parece muito com fibras de carne.

[056] Proteínas de soja isoladas podem ser fabricadas de flocos de soja desengordurados por separação da proteína de soja tanto de carboidrato solúvel quanto insolúvel da fava de soja.

[057] Proteína de soja adequada para o uso na presente abordagem inclui proteína vegetal texturizada da marca TVP® Archer-Daniels-Midland Company's (Decatur, IL). Tal proteína de soja é um produto de comércio contendo nominalmente cerca de 53% de proteína, cerca de 3% de gordura, cerca de 18% de fibra dietética total, cerca de 30% de carboidratos e cerca de 9% de umidade máxima. Este material é disponível em uma variedade de texturas, tamanhos e cores e é usado na indústria de alimento como um substituto para carne moída em bifês de carne moída, salsicha, alimentos vegetarianos, mistura de carne moída e outras aplicações de alimentos similares. Um produto preferido é Archer-Daniels-Midland Co. product code 165 840, que é fornecido na forma de grânulos amarelo desbotado de cerca de diâmetro de 1/16 polegadas.

[058] Proteína de soja fabricada de acordo com outros processos é também usada na presente abordagem. Por exemplo, a proteína de soja pode também ser como proteínas vegetais texturizadas descritas na patente U.S. 4.103.034 e 4.153.738, que são por meio destas incorporadas pela referência.

[059] A presente abordagem também diz respeito a usar um meio de purificação não modificado para reduzir dentro de um

substrato de gordura ou óleo os constituintes que causam ou aparecem da degradação de gordura ou óleo. Dessa maneira, o método de fabricar um produto esterificado, transesterificado ou interesterificado pode compreender adicionalmente fazer contato com o substrato inicial (gorduras ou óleos sozinhos, ou misturados com componentes adicionais tais como ésteres, ácidos livres de gordura ou álcoois) com um ou mais tipos de meio de purificação não modificado produzindo dessa maneira um substrato processado por meio de purificação. O meio de purificação pode fazer contato com o substrato em uma ou mais colunas ou em uma ou mais reações do tipo lama em lotes. O meio de purificação preferivelmente entra em contato com o substrato antes de o substrato entrar em contato com a enzima. Qualquer meio de purificação e métodos de uso descritos no pedido de publicação de patente U.S.2003/0054509 A1 podem ser usados junto com a presente abordagem, e são por meio destas incorporadas pela referência.

[060] Desodorização pode ser usada junto com as técnicas de purificação descritas pela presente abordagem. Exemplos de processos de desodorização incluem as técnicas de desodorização descritas por O. L. Brekke, *Deodorization, in Handbook of Soy Oil Processing and Utilization*, Erickson, D. R. et al. eds., pp. 155-191 publicada pela American Soybean Association and the American Oil Chemists' Society; or by Bailey's *Industrial Oil and Fat Products*, 5a ed., Vol. 2 (pp. 537-540) and Vol. 4 (pp. 339-390), Hui, Y. H. ed., publicado por John Wiley e Sons, Inc. Desodorização a temperatura ambiente pode também ser usada da forma como ela será removido do ar do

óleo, que causa oxidação de óleo. Outros processos de desodorização são descritos nas Patentes U.S. Nos. 6.172.248 e 6.511.690; e no pedido de publicação de patente U.S. 2005/0014237 A1. Todas essas técnicas de desodorização são por meio destas incorporadas pela referência. Em uma modalidade preferida, os métodos de pré-tratamento da presente abordagem obviam a necessidade para desodorização de substrato antes do contato com a lipase.

[061] A presente abordagem também contempla prevenir oxidação do substrato do óleo mantendo o óleo sob gases inertes, tais como nitrogênio, dióxido de carbono ou hélio durante ou após a purificação. Os produtos esterificados, transesterificados ou interesterificados da presente abordagem também podem ser desodorizados após o tratamento com enzima.

[062] Com o propósito aqui, o termo "substrato inicial" inclui gorduras ou óleos refinados ou não refinados, branqueados ou não branqueados e/ou desodorizados ou não desodorizados. As gorduras ou óleos podem compreender um gordura ou óleo simples ou combinações de várias gorduras ou óleos. De acordo com a presente abordagem, um substrato pode ser reciclado (isto é, desodorizados, colocados em contato com meio de purificação, esterificado, transesterificado ou interesterificado mais que uma vez). Consequentemente, versados na técnica reconheceriam que "substrato inicial" inclui i) substratos que nunca foram desodorizados, ii) substratos que foram desodorizados uma ou mais vezes, iii) substratos que jamais entraram em contato com o meio de purificação, iv) substratos que tiveram contato com o meio de purificação uma ou

mais vezes, v) substratos que nunca foram esterificados, transesterificados ou interesterificados, e vi) substratos que foram esterificados, transesterificados ou interesterificados uma ou mais vezes. O processo de esterificação, transesterificação ou interesterificação pode ser catalisado enzimaticamente, tal como com um lipase, ou quimicamente, tal como com álcali ou catalisadores alcóxido.

[063] Os termos "substrato processado por meio de purificação" ou "substrato purificado" referem-se a um substrato que entrou em contato com um ou mais meio de purificação pelo menos uma vez. Antes do seu contato com enzima, um substrato inicial ou um substrato processado por meio de purificação pode ser misturado com componentes adicionais incluindo ésteres, ácidos livres de gordura ou álcoois. Estes ésteres, ácidos livres de gordura ou álcoois que são adicionados ao substrato inicial ou substrato processado por meio de purificação podem opcionalmente entrar em contato com o meio de purificação antes de fazer contato com enzima.

[064] Os termos "produto" e "produto esterificado, transesterificado ou interesterificado" são usados intercambiavelmente e incluem gorduras esterificadas, transesterificadas ou interesterificadas, óleos, triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, álcoois mono ou poliídrolícos, ou ésteres de álcoois mono ou poliídrolícos produzidos por meio da transesterificação enzimática ou processo de esterificação. O termo "produto" da forma aqui usada tem entrado em contato pelo menos uma vez com uma enzima capaz de causar esterificação, transesterificação ou interesterificação. Um produto po-

de ser um fluido ou sólido a temperatura ambiente, e é aumentado em seu teor proporcional de gorduras esterificadas, transesterificadas ou interesterificadas, óleos, triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, álcoois mono ou poli-hidroxicos, ou ésteres de álcoois mono ou poli-hidroxicos como um resultado de seu contato com a enzima de transesterificação ou esterificação. Produto esterificado, transesterificado ou interesterificado é para ser distinguido a partir de teores de substrato inicial ou substrato processado por meio de purificação, em que o produto tem submetido reação de transesterificação ou esterificação enzimática adicional. A presente abordagem contempla o uso de qualquer combinação dos processos de desodorização, purificação e transesterificação ou de esterificação para a produção de gorduras esterificadas, transesterificadas ou interesterificadas, óleos, triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, álcoois mono ou poli-hidroxicos, ou ésteres de álcoois mono ou poli-hidroxicos.

[065] O termo "enzima" da forma usada no método da presente abordagem inclui, mas sem limitações, lipases da maneira aqui discutida, ou qualquer outra enzima capaz de causar modificar gorduras ou óleos, tal como pela esterificação, transesterificação, ou interesterificação de substrato. Outras enzimas capazes de modificar gorduras e óleos incluem, mas sem limitações, oxidoreduções, peroxidases e esterases.

[066] Gorduras e óleos são compostos principalmente de triglicerídeos feitos de uma espinha dorsal de glicerol nas quais os grupos hidroxila são esterificados com ácidos carboxílicos. Ao passo que gorduras sólidas tendem a ser formadas

por triglicerídeos tendo ácidos graxos saturados, triglicerídeos com ácidos graxos insaturados tendem a ser líquidos (óleos) a temperatura ambiente. Monoglicerídeos e diglicerídeos, tendo respectivamente um éster de ácido graxo e dois grupos alcoólicos ou dois ésteres de ácido graxo e um grupo alcoólico, também são encontrados em gorduras e óleos em uma menor quantidade do que os triglicerídeos.

[067] Glicerídeos usados na presente abordagem incluem moléculas da fórmula química $\text{CH}_2\text{RCHR}'\text{CH}_2\text{R}''$ em que R, R' e R'' são álcoois (OH) ou grupos de ácido graxo dados por $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}'''$, em que R''' é uma cadeia de carbono saturada, insaturada ou poli-insaturada, reta ou ramificada com ou sem substituintes. R, R', R'' e os grupos de ácido graxo em um glicerídeo dado podem ser os mesmos ou diferentes. Os grupos do ácido R, R' e R'' podem ser obtidos de qualquer um dos ácidos livres de gordura aqui descritos. Glicerídeos para a presente abordagem incluem triglicerídeos nos quais R, R' e R'' são todos os grupos de ácido graxo, diglicerídeos nos quais dois de R, R' e R'' são grupos de ácido graxo e uma funcionalidade do álcool é presente; monoglicerídeos nos quais um de R, R' e R'' é um grupo de ácido graxo e duas funcionalidades do álcool são presentes; e glicerol no qual cada qual de R, R' e R'' é um grupo álcool. Glicerídeos usados como materiais de partida da presente abordagem incluem gorduras e óleos naturais, gorduras e óleos processados, gorduras e óleos refinados, gorduras e óleos refinados e branqueados, gorduras e óleos refinados, branqueados e desodorizados, gorduras e óleos expelidos, e gorduras e óleos sintéticos. O

processo pode também ser realizado na presença de um substrato em contato com um solvente. Um exemplo é miscela de óleo de fava de soja, que é o produto de extração do solvente de óleo de fava de soja e muitas vezes compreende óleo de fava de soja bruto em hexano. Exemplos de gorduras e óleos refinados são aqui descritos em Stauffer, C., *fats and oils*, Eagan Press, St. Paul, Mims. (1996). Exemplos de gorduras e óleos processados são refinados, gorduras e óleos refinados e branqueados, hidrogenados e fracionados.

[068] Os termos "grupos de ácido graxo" ou "grupos ácido" ambos referem-se a grupos químicos dados por $-OC(=O)R'''$. Tais "grupos de ácido graxo" ou "grupos ácido" são conectados ao restante do glicerídeo por meio de uma ligação covalente ao átomo de oxigênio que é unicamente ligado ao carbono da carbonila. Ao contrário, os termos "ácido graxo" ou "ácido graxo livre" ambos referem-se a $HOC(=O)R'''$ e não são covalentemente ligados a um glicerídeo. Em "grupos de ácido graxo", "grupos ácido", "ácidos livres de gordura", e "ácidos graxos", R''' é uma cadeia de carbono saturada, insaturada ou poliinsaturada, reta ou ramificada com ou sem substituintes, da forma aqui discutida. Versados na técnica reconhecerão que R''' dos "ácidos livres de gordura" ou "ácidos graxos" (isto é, $HOC(=O)R'''$) aqui descritos são usados como R''' nos "grupos de ácido graxo" ou "grupos ácido" anexados aos glicerídeos ou a outros ésteres usados como substratos na presente abordagem. Isto é, um substrato da presente abordagem pode compreender gorduras, óleos ou outros ésteres tendo grupos de ácido graxo formados a partir dos ácidos livres de gordura ou

ácidos graxos aqui discutidos.

[069] Um ou mais gordura de manteiga, manteiga de cacau, substitutos de manteiga de cacau, gordura de ilipê, manteiga de kokum, gordura de leite, gordura *mowrah*, manteiga *phulwara*, gordura de sal, manteiga de karité, sebo de bornéu, banha de porco, lanolina, gordura de boi, gordura de carneiro, gordura de vela, gordura animal, óleo de canola, óleo de rícino, óleo de coco, óleo de coentro, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de avelã, óleo de cânhamo, óleo de pinho manso (*jatropha*), óleo de semente de linho, óleo de semente de manga, óleo de limnanto (*meadowfoam*), óleo de mostarda, óleo de mocotó, óleo de oliva, óleo de palmeira, óleo de semente de palmeira, óleo de amendoim, óleo de semente de colza, óleo de farelo de arroz, óleo de açafroa, óleo de sasanqua, manteiga de karité, óleo de soja, óleo de semente de girassol, óleo de pinho, óleo de tsubaki, óleos vegetais, óleos marinhos que podem ser convertidos em gorduras plásticas, óleos marinhos que podem ser convertidos em gorduras sólidas, óleo de peixe, óleo de peixe-carvão do Pacífico, óleo de fígado de bacalhau, óleo de peixe olho-de-vidro laranja, óleo *pileherd*, óleo de sardinha, óleos de baleia, óleos de arenque, 1,3-dipalmitoil-2-monooleína (POP), 1(3) palmitoil-3(1)-estearoil-2-monooleína (POST), 1,3-diestearoil-2-monooleína (StOSt), triglicerídeo, diglicerídeo, monoglicerídeo, triglicerídeo do ácido beênico, trioieína, tripalmitina, tristearina, óleo de palmeira, estearina de palmeira, óleo de semente de palmeira, estearina de semente de palmeira, glicerídeos de ácidos graxos de cadeia média, ou suas combinações.

[070] Gorduras e óleos processados tais como gorduras e óleos hidrogenados ou fracionados também podem ser usados. Exemplos de gorduras fracionadas incluem óleo de palmeira, estearina de palmeira, óleo de semente de palmeira, e estearina de semente de palmeira. Formas totalmente ou parcialmente hidrogenadas, saturadas, insaturadas ou poliinsaturadas das gorduras supralistadas, óleos, triglicerídeos ou diglicerídeos também são usados para a presente abordagem. Para o método desta abordagem, as gorduras descritas, óleos, triglicerídeos ou diglicerídeos são usáveis unicamente, ou pelo menos dois deles podem ser usados na mistura.

[071] "Esterificação" ou "transesterificação" são os processos pelos quais um grupo de ácido graxo é adicionado, repositionado ou substituído em um ou mais componentes do substrato. O grupo ácido pode ser derivado de uma gordura ou óleo que é parte do substrato inicial, ou de um ácido graxo livre ou éster que foi adicionado ao substrato inicial ou substrato processado por meio de purificação.

[072] O termo "esterificação" inclui o processo no qual R, R' ou R'' em um glicerídeo é convertido de um grupo alcoólico (OH) para um grupo de ácido graxo dado por $-OC(=O)R'''$. O grupo de ácido graxo que substitui o grupo alcoólico pode vir a partir do mesmo glicerídeo ou diferente glicerídeo, ou de um ácido graxo livre ou éster que foi adicionado ao substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação. A presente abordagem também contempla esterificação de álcoois que foram adicionados ao substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação. Por exemplo, um ál-

cool assim adicionado pode ser esterificado por um ácido graxo livre adicionado ou por um grupo de ácido graxo presente em um glicerídeo que foi um componente do substrato inicial. Um exemplo não limitante de esterificação inclui reação de um ácido graxo livre com um álcool.

[073] Esterificação também inclui processos pertencendo à fabricação de biodiesel, tal como discutido nas Patentes U.S. Nos. 5.578.090; 5.713.965; e 6.398.707, que são por meio destas incorporadas pela referência. O termo "biodiesel" inclui ésteres de alquila inferior de grupos de ácido graxo encontrados em glicerídeos animais ou vegetais. Ésteres de alquila inferior incluem éster de metila, éster de etila, éster de n-propila, e éster de isopropila. Na produção de biodiesel, o substrato inicial compreende gorduras ou óleos. Um ou mais álcoois inferiores (por exemplo, metanol, etanol, n-propanol e isopropanol) são adicionados a este substrato e a mistura em seguida entra em contato com enzima. A enzima faz com que os álcoois a serem esterificados com os grupos de ácido graxo que é parte dos glicerídeos de gordura ou óleo. Por exemplo, R, R' ou R'' em um glicerídeo é um grupo de ácido graxo dado por $-OC(=O)R'''$. Mediante esterificação de metanol, o produto do biodiesel é $CH_3OC(=O)R'''$. Produtos do biodiesel também incluem esterificação de álcoois inferiores com ácidos livres de gordura ou outros ésteres que são adicionados ao substrato inicial ou substrato processado por meio de purificação.

[074] O termo "transesterificação" inclui o processo no qual R, W ou R'' em um glicerídeo é um primeiro grupo de ácido graxo dado por $-OC(=O)R'''$, e o primeiro grupo de ácido

graxo é substituído por um segundo grupo de ácido graxo diferente. O segundo grupo de ácido graxo que substitui o primeiro grupo de ácido graxo pode vir a partir da mesma ou diferente gordura ou óleo presente no substrato inicial. O segundo ácido graxo pode também vir de um ácido graxo livre ou éster adicionado ao substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação. A presente abordagem também contempla transesterificação ou interesterificação de álcoois ou outros ésteres esterificados que foram adicionados ao substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação. Por exemplo, um álcool assim adicionado pode ser transesterificado ou interesterificado por um ácido graxo livre adicionado, por um grupo de ácido graxo em um éster adicionado, ou por um grupo de ácido graxo presente em um glicerídeo que foi um componente do substrato inicial. Um exemplo não limitante de transesterificação inclui reação de uma gordura ou óleo com um álcool (por exemplo, metanol) ou com um éster.

[075] O termo "interesterificação" inclui, por exemplo, o processo de acidólise, alcoólise, glicerólise e transesterificação. Exemplos destes processos são aqui descritos, em Fousseau, D. and Marangoni, A.G., "Chemical Interesterification of Food Lipids: Theory and Practice", in *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition, Revised and Expanded*, Akoh, C.C. and Min, D.B. eds., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, Chapter 10, que é por meio desta incorporada pela referência. Acidólise inclui a reação de um ácido graxo com um éster, tal como um triacilglicerol; alcoólise inclui a reação de um álcool com um éster, tal como um tria-

cilglicerol; e glicerólise inclui reações de alcoólise nas quais o álcool é glicerol. Um exemplo não limitante de interesterificação ou transesterificação inclui reações de diferentes triglicerídeos resultando em reorganização dos grupos de ácido graxo nos glicerídeos e triglicerídeos resultantes.

[076] Um produto esterificado, transesterificado ou interesterificado foram respectivamente submetidos ao processo de esterificação, transesterificação ou interesterificação. A presente abordagem diz respeito às enzimas capazes de efetuar o processo de esterificação, transesterificação ou de interesterificação para gorduras, óleos, triglicerídeos, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos livres de gordura, álcoois mono ou poliídrolícos, ou ésteres de álcoois mono ou poliídrolícos.

[077] Da forma aqui usada, a "meia vida" de uma enzima é o tempo no qual a atividade enzimática de uma amostra de enzima é diminuída pela metade. Se, por exemplo, uma amostra de enzima diminui sua atividade relativa de 100 unidades para 50 unidades em 10 minutos, então a meia vida da amostra de enzima é 10 minutos. Se a meia vida desta amostra é constante, então a atividade relativa será reduzida de 100 para 25 em 20 minutos (duas meias vidas), a atividade relativa será reduzida de 100 para 12,5 em 30 minutos (três meias vidas), a atividade relativa será reduzida de 100 para 6,25 em 40 minutos (quatro meias vidas), etc. Da forma aqui usada, a expressão "meia vida de uma enzima" significa a meia vida de uma amostra enzimática.

[078] Uma meia vida "prolongada" refere-se a uma "meia

vida" maior. Prolongar a meia vida de uma enzima resulta em aumentar a meia vida de uma enzima por cerca de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120%, 125%, 130%, 135%, 140%, 145%, 150%, 155%, 160%, 165%, 170%, 175%, 180%, 185%, 190%, 195%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, 320%, 340%, 360%, 380%, 400%, 420%, 440%, 460%, 480%, 500% ou mais comparado à meia vida de uma enzima usada em um processo de produção de gordura ou óleo esterificado, transesterificado ou interesterificado que não emprega um meio de purificação.

[079] Exemplos não limitantes de "constituintes que causam ou aparecem da degradação de gordura ou óleo" incluem espécie oxidativa ou de oxidação, espécie de oxigênio reativa, produtos de oxidação de gordura ou óleo, peróxidos, ozônio (O_3), O_2 , superóxido, ácidos livres de gordura, compostos voláteis e orgânicos, radicais livres, metais traços, e pró-oxidantes naturais tal como clorofila. Tais constituintes também incluem outros compostos caracterizados ou não caracterizados reconhecidos pelos versados na técnica para causar ou surgir da degradação de gordura ou óleo. Tais constituintes podem surgir a partir de caminhos de oxidação, ou a partir de outros caminhos reconhecidos pelos versados na técnica para resultar em degradação de gordura ou óleo. "Reduzir" os constituintes que causam ou aparecem da degradação de gordura ou óleo em uma amostra do substrato refere-se a baixar a concentração, porcentagem ou tipos de tais constituintes na

amostra.

[080] O método de fazer um produto esterificado, transesterificado ou interesterificado pode compreender adicionalmente misturar o substrato inicial e/ou o substrato processado por meio de purificação com a enzima em um ou mais tanques para uma reação de lama em lotes, ou escoar o substrato inicial e/ou o substrato processado por meio de purificação através de uma coluna contendo a enzima. Um leito de um ou mais tipos de meio de purificação pode ser colocado sob um leito da enzima dentro de uma coluna à montante a partir de enzima.

[081] O substrato inicial, o substrato processado por meio de purificação, o produto e a enzima esterificados, transesterificados ou interesterificados podem ser em um meio ambiente de gás inerte. O gás inerte pode ser selecionado a partir de grupo que consiste em N_2 , CO_2 , He, Ar e Ne. Preferivelmente, os métodos da presente abordagem compreendem adicionalmente prevenir degradação oxidativa do substrato inicial, o substrato processado por meio de purificação, o produto esterificado, transesterificado ou interesterificado ou a enzima. O método de fazer um produto esterificado, transesterificado ou interesterificado pode compreender adicionalmente prevenir degradação oxidativa ao substrato inicial, o substrato processado por meio de purificação, o produto esterificado, transesterificado ou interesterificado ou a enzima.

[082] Versados na técnica reconhecerão que com relação ao método de fazer um produto esterificado, transesterificado ou interesterificado, qualquer combinação das particularidades

descritas anteriormente pertencentes a opções de desodorização (por exemplo, vazão, tempo de permanência ou residência, temperatura, pressão, escolha de gás inerte), substrato inicial, componentes (por exemplo; ácidos livres de gordura, ésteres não glicerídeos, álcoois) opcionalmente adicionados ao substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação, enzima, monitorar ou ajustar métodos, gorduras ou óleos produzidos, uso de colunas ou reações de lama em lotes, e meio de purificação são usados na presente abordagem.

[083] Transesterificação, esterificação ou interesterificação de acordo com a presente abordagem é efetuada por um lipase. A lipase pode ser específica ou não específica com relação a seu substrato. O substrato inicial pode ser composto de um ou mais tipos de gordura ou óleo e tem suas propriedades físicas modificadas em um processo de esterificação, transesterificação ou de interesterificação. Enzimas não seletivas causam reorganização por transesterificação em todas as três posições em um glicerídeo e podem resultar em randomização em equilíbrio termodinâmico; mas 1,3-lipases específicas causam reorganizações preferivelmente nas posições sn-1 e sn-3 em um glicerídeo. Por exemplo, quando uma mistura de óleo de oliva e óleo de semente de palma totalmente hidrogenado é tratado com uma enzima não seletiva, os componentes do produto têm diferentes propriedades físicas de qualquer dos substratos iniciais. Tanto 1,3-lipases específicas quanto lipases não seletivas são capazes deste processo de reorganização.

[084] Preferivelmente, a lipase é uma lipase 1,3-

seletiva, que preferivelmente catalisa esterificação ou transesterificação dos ésteres terminais nas posições sn-1 e sn-3 de um glicerídeo. A lipase pode também ser uma lipase não seletiva, não específica. O processo pode produzir gorduras esterificadas, transesterificadas ou interesterificadas sem nenhum ou poucos ácidos graxos trans para margarina, banha, e outras gorduras de confeitaria tal como manteiga de cacau substituta. O produto esterificado, transesterificado ou interesterificado pode também ser um 1,3-diglicerídeo, tal como o revelado em Patente U.S. No. 6.004.611.

[085] A enzima usada de acordo com a presente abordagem pode ser um lipase obtido de uma linha celular eucariótica ou procariótica cultivada ou tecido animal. Tais lipases tipicamente incorrem em uma das três categorias (Macrae, A. R., *J.A.O.C.S* 60:243A 246A (1983)). A primeira categoria inclui não lipases específicas capazes de liberar ou ligar qualquer grupo de ácido graxo de ou para qualquer posição de glicerídeo. Tais lipases foram obtidas de *Candida cylindracea*, *Coiynebacterium acnes* and *Stafilococcus aureus* (Macrae, 1983; U.S. Pat. No. 5,128,251). A segunda categoria de lipases somente adiciona ou remove grupos de ácido graxo específicos para ou de glicerídeos específicos. Assim, estas lipases são usadas em produzir ou modificar glicerídeos específicos. Tais lipases foram obtidas de *Geotrichum candidium* and *Rhizopus*, *Aspergillus*, and *Mucor* genera (Macrae, 1983; U.S. Pat. No. 5,128,251). A última categoria de lipases preferivelmente catalisa a remoção ou adição de grupos de ácido graxo a partir de carbonos de glicerídeo no final nas posições 1

e 3. Tais lipases foram obtidas de *Thermomyces lanuginosa*, *Rhizomucor naiehei*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus delemar*, acid *Rhizopus arrhizus* (Macrae, 1983). Enzimas de fontes animais, tal como lipase pâncreas de porco, também podem ser usadas.

[086] São muitos micro-organismos a partir dos quais as lipases usadas na presente abordagem são obtidas. Patente U.S. No. 5.219.733 lista exemplos de tais micro-organismos incluindo os do gênero *Achromobacter* tal como *A. iofurgus* and *lipoliticum*; o gênero *Chromobacterium* tal como *C. viscosum* var. *paralipoliticum*; o gênero *Corynebacterium* tal como *C. Acnes*; o gênero *Stafilococcus* tal como *S. Aureus*; o gênero *Aspergillus* tal como *A. niger* and *A. Oryzae*; o gênero *Candida* tal como *C. cilindracea*, *C. Antarctica b*, *C. rosa* and *C. rugosa*; o gênero *Humicola* tal como *H. lanuginosa*; o gênero *Penicillium* tal como *P. caseicolum*, *P. crustosum*, *P. cyclopium* and *P. roqueforti*; o gênero *Torulopsis* tal como *T. ernobii*; o gênero *Mucor* tal como *M nziehei*, *M. japonicas* and *M. javanicus*; o gênero *Bacillus* tal como *subtilis*; o gênero *Thermomyces* tal como *T. ibadanensis* and *T. lanuginosa* (ver Zhang, H. et al. *J.A.O. C.S.* 78: 57-64 (2001)); o gênero *Rhizopus* tal como *R. delemar*, *R. japonicas*, *R. Arrhizus* and *R. neveux*; o gênero *Pseudomonas* tal como *P. Aeruginosa*, *P. fragi*, *P. cepacia*, *P. mephitica* var. *lipolitica* and *P. fluorescens*; o gênero *Alcaligenes*; o gênero *Rhizomucor* tal como *R. miehei*; o *genus* *Humicolo* tal como *H. rosa*; e o gênero *Geotrichum* tal como *G. candidum*. Diversas lipases obtidas destes organismos são comercialmente disponíveis como enzimas purificadas. Ver-

sados na técnica reconhecerão outras enzimas capazes de realizar esterificação, transesterificação ou interesterificação incluindo outras lipases usadas para a presente abordagem.

[087] Lipases obtidas a partir dos organismos anteriores são imobilizadas para a presente abordagem em veículos adequados por um método usual conhecido pelos versados na técnica. Patentes U.S 4.798.793; 5.166.064; 5.219.733; 5.292.649; e 5.773.266 descrevem exemplos de lipase imobilizada e métodos de preparação. Exemplos de métodos de preparação incluem o método aprisionamento, veículo inorgânico método de ligação covalente, ligação de veículo orgânico método covalente, e o método de adsorção. A lipase usada nos exemplos a seguir foi obtida de Novozimas (Denmark) mas pode ser substituída com lipase purificada e/ou imobilizada preparada por outras. A presente abordagem também contempla o uso preparações de enzima bruta ou células de micro-organismos capazes de sobre expressar lipase, uma cultura de tais células, uma solução de enzima do substrato obtida tratando a cultura, ou uma composição contendo a enzima. A presente abordagem também contempla o uso de mais que uma preparação de enzima, tal como mais que uma preparação de lipase.

[088] Patentes U.S 4.940.845 e 5.219.733 descrevem as características de diversos veículos usados. Veículos usados são preferivelmente microporosos e têm uma superfície porosa hidrofóbica. Normalmente, os poros têm uma proporção média de cerca de 10 Å a cerca de 1.000 Å, e uma porosidade de cerca de 20 a cerca de 80% por volume, mais preferivelmente, de cerca de 40 a cerca de 60% por volume. Os poros deram ao veí-

culo uma área de ligação à enzima maior por partícula do veículo. Exemplos de veículos inorgânicos preferidos incluem vidro poroso, cerâmicas porosas, celite, partículas metálicas porosas tais como titânio óxido, aço inoxidável ou alumina, sílica gel porosa, peneira molecular, carbono ativo, argila, caulimita, perlita, fibras de vidro, terra diatomácea, bentonita, hidroxiapatita, gel de cálcio fosfato, e alquilamina derivados de veículos inorgânico. Exemplos de veículos orgânicos preferidos incluem Teflon microporoso, polímero olefínico alifático (por exemplo, polietilena, polipropileno, um homo- ou copolímero de estireno ou uma mistura deste ou um suporte inorgânico pré-tratado) náilon, poliamidas, policarbonatos, nitrocelulose e acetilcelulose. Outros veículos orgânicos adequados incluem polissacarídeos hidrofílicos tais como gel de agarose com um grupo hidrofóbico alquila, fenila, tritiala ou outro similar para fornecer uma superfície porosa hidrofóbica (por exemplo, "Octil-Sefarose CL-4B", "Fenil-Sefarose CL-4B", ambos produtos de Pharmacia Fine Chemicals (Kalamazoo, Michigan). Resinas de adsorção microporosas incluem aquelas feitas de estireno ou polímero alquilamino, resina de quelato, resina de troca iônica "DOWER MWA-1" como essa (resina de troca aniônica fracamente básica fabricada por Dow Chemical Co., tendo uma amina terciária como o grupo de troca, compostos basicamente de cadeias de poliestireno reticuladas com divinilbenzeno, 150 Å em raio de poro médio e malha 20-50 em tamanho de partícula), e resina de celulose hidrofílica, tal como um preparado mascarando o grupo hidrofílico de um veículo celulósico, por exemplo, "Cellulofine

GC700-m" (produto de Chisso Corporation (Tokyo, Japan), 45-105 μm em tamanho de partícula).

[089] A esterificação, transesterificação ou interesterificação pode ser conduzida em uma coluna ou em reações do tipo lama em lotes como descrito na seção dos exemplos a seguir. Nas reações de lama em lotes, a enzima e substratos são misturados vigorosamente para assegurar um bom contato entre eles, tomando cuidado para não misturar sob alto cisalhamento, que causaria perda da atividade da enzima. Preferivelmente, a reação de transesterificação ou esterificação é realizada em um reator de leito fixado com lipases imobilizadas.

[090] Os grupos de ácido graxo aqui descritos podem ser adicionados ao substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação para esterificar grupos alcoólico presentes em glicerídeos do substrato inicial, ou grupo alcoólicos de outros compostos (por exemplo, álcoois ou ésteres) adicionados ao substrato processado por meio de purificação. Glicerídeos tendo qualquer dos grupos de ácido graxo como aqui descrito também podem ser usados no substrato inicial; e outros ésteres tendo qualquer dos grupos de ácido graxo aqui descritos podem ser adicionados ao substrato inicial ou substrato processado por meio de purificação. Tais ácidos graxos incluem cadeia reta saturada ou grupos de ácido graxo ramificados, cadeia reta insaturada ou grupos de ácido graxo ramificados, grupos de ácido graxo hidróxi, e grupos ácido policarboxílico, ou contêm substituintes não carbono incluindo oxigênio, enxofre ou nitrogênio. Os grupos de ácido graxo podem ser de ocorrência natural, processados ou refina-

dos de produtos naturais ou sinteticamente produzidos. Embora não haja nenhum limite superior ou inferior para o comprimento da cadeia de carbono maior em ácidos graxos usados, é preferível que seu comprimento seja cerca de 6 a cerca de 34 carbonos de comprimento. Grupos de ácido graxo específicos usados para a presente abordagem podem ser formados a partir dos ácidos graxos descritos nas patentes U.S. 4.883.684; 5.124.166; 5.149.642; 5.219.733; e 5.399.728.

[091] Exemplos de grupos de ácido graxo de cadeia reta saturada usados tendo um número par de átomos de carbono podem ser formados a partir dos ácidos graxos descritos na Patente U.S. No. 5.219.733 incluindo ácido acético, ácido butírico, ácido caprótico, ácido caprílico, ácido cáprico ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido arácico, ácido beênico, ácido lignocérico, ácido hexacosanoico, ácido octacosanoico, ácido triacontanoico, ácido n-dotriacontanoico, e aqueles com um número ímpar de átomos de carbono, tais como ácido propiônico, ácido n-valérico, ácido enântico, ácido pelargônico, ácido hendecanoico, ácido tridecanoico, ácido pentadecanoico, ácido heptadecanoico, ácido nonadecanoico, ácido heneicosanoico, ácido tricossanoico, ácido pentacosanoico e ácido heptacosanoico.

[092] Exemplos de grupos de ácido graxo ramificados saturados usados podem ser formados dos ácidos graxos descritos na Patente U.S. No. 5.219.733 incluindo ácido isobutírico, ácido isocaprótico, ácido isocaprílico, ácido isocáprico ácido isoláurico, ácido 11-metildodecanoico, ácido isomirístico, ácido 13-metil-tetradecanoico, ácido isopalmítico, ácido 15-

metilexadecanóico, ácido isoesteárico, ácido 17-metiloctadecanóico, ácido isoarácico, ácido 19-metileicossanóico, ácido α -etil-hexanóico, ácido α -hexildecanóico, ácido α -heptilundecanóico, ácido 2-deciltetradecanóico, 2-ácido undeciltetradecanóico, ácido 2-decilpentadecanóico, ácido 2-undecilpentadecanóico, e ácido Fine oxocol 1800 (produto de Nissan Chemical Industries, Ltd.)

[093] Exemplos de grupos de ácido graxo ramificados de carbono ímpar saturados usados podem ser formados dos ácidos graxos descritos na Patente U.S. 5.219.733 incluindo ácidos graxos anteiso terminando com um grupo isobutila, tais como ácido 6-metil-octanóico, ácido 8 metil-decanóico, ácido 10-metil-dodecenóico, ácido 12-metil-tetradecanóico, ácido 14-metilexadecanóico, ácido 16-metil-octadecenóico, ácido 18-metil-eicossanóico, ácido 20-metil-docossanóico, ácido 22-metil tetracosanóico, ácido 24-metil-hexacosanóico e 26-ácido metiloctacosanóico.

[094] Exemplos de grupos de ácido graxo insaturados usados podem ser formados de ácidos graxos descritos na Patente U.S. 5.219.733 incluindo ácido 4-decenóico, ácido caproléico, ácido 4-dodecenóico, ácido 5-dodecenóico, ácido lauroléico, ácido 4-tetradecenóico, ácido 5-tetradecenóico, ácido 9-tetradecenóico, ácido panitoléico, ácido 6-octadecenóico, ácido oléico, ácido 9-octadecenóico, ácido 11-octadecenóico, ácido 9-eicossenóico, ácido cis-11-eicossenóico, ácido cetoléico, ácido 13-docossenóico, ácido 15-tetracosenóico, ácido 17-hexacosenóico, ácido 6,9,12,15 hexadecatetraenóico, ácido linoléico, ácido linilênico, ácido α -eleosteárico, ácido β -

leoesteárico, ácido punícico, ácido 6,9,12,15-octaríecatetraenóico, ácido parinárico, ácido 5,8,11,14-eicossatetraenóico, ácido 5,8,11,14,17-eicossapentaenóico (EPA), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenóico, ácido 4,7,10,13,16,19-docossaexaenóico (DHA) e similares.

[095] Exemplos de grupos de ácido graxo hidróxi usados podem ser formados de ácidos graxos descritos na Patente U.S. 5.219.733 incluindo ácido α -hidroxiláurico, ácido α -hidroximirístico, ácido α -hidroxipalmítico, ácido α -hidroxiesteárico, ácido α -hidroxiláurico, ácido α -hidroxiarácico, ácido 9-hidróxi-12-octadecenóico, ácido ricinoléico, ácido α -hidroxibeênico, 9-hidróxi-trans-10,12-ácido octadecadienóico, ácido camolênico, ácido ipuróico, ácido 9,10-diidroxiesteárico, ácido 12 hidroxiesteárico e similares.

[096] Exemplos de grupos do ácido graxo de ácido policarboxílico usados podem ser formados de ácidos graxos descritos na Patente U.S. 5.219,733 incluindo ácido oxálico, ácido cítrico, ácido malônico, ácido succínico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido pimélico, ácido subérico, ácido azeláico, ácido sebácico, ácido D,L-málico e similares.

[097] Preferivelmente, os grupos de ácido graxo têm cadeias de carbono de cerca de 4 a cerca de 34 carbonos de comprimento. Mais preferivelmente, os grupos de ácido graxo têm cadeias de carbono de cerca de 4 a cerca de 26 carbonos de comprimento. Mais preferivelmente, os grupos de ácido graxo têm cadeias de carbono de cerca de 4 a cerca de 22 carbonos de comprimento. Preferivelmente os grupos de ácido graxo são formados a partir do grupo seguinte de ácidos livres de gor-

dura: ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico, ácido araquidônico, ácido erú-cico, ácido capróico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido eicossapentanóico (EPA), ácido docossaexaenóico (DHA), ácido láurico, ácido mirístico, ácido 5-eicossenóico, ácido butíri-co, ácido γ -linolênico e ácido linoléico conjugado. Grupos de ácido graxo formados de ácidos graxos derivado de várias plantas e gorduras animais e óleos (tais como ácidos graxos de óleo de peixe) e ácidos graxos processados ou refinados de planta e gorduras animais e óleos (tal como ácidos graxos de óleo de peixe fracionados nos quais EPA e DHA são concentra-dos) também podem ser adicionados. Grupos de ácido graxo tam-bém podem ser formados de ácidos graxos de cadeia média (como descrito por Merolli, A. et al., *MFO*, 8:597-603 (1997)). Também preferivelmente, os grupos de ácido graxo são formados de ácidos livres de gordura tendo cadeias de carbono de cerca de 4 a cerca de 36, cerca de 4 a cerca de 24, ou cerca de 4 a cerca de 22 carbonos de comprimento.

[098] Álcoois ou ésteres de álcoois também podem ser adi-cionados ao substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação. Estes álcoois e ésteres podem ser este-rificados, transesterificados ou interesterificados por gru-pos do ácido presentes nos glicerídeos do substrato inicial. Alternativamente, estes álcoois ou ésteres destes podem ser esterificados, transesterificados ou interesterificados por ácidos livres de gordura ou ésteres adicionados ao substrato processado por meio de purificação. "Ésteres" incluem qual-quer um dos álcoois aqui descritos esterificados por qualquer

um dos ácidos graxos aqui descritos.

[099] Exemplos de ésteres usados sem ser glicerídeos incluem ésteres de cera, ésteres de alquila tais como metila, etila, isopropila, hexadecila ou ésteres de octadecila, ésteres de arila, ésteres de propileno glicol, ésteres de etileno glicol, ésteres de 1,2-propanodiol e ésteres de 1,3-propanodiol. Ésteres podem ser formados a partir de esterificação, transesterificação ou interesterificação de álcoois monoidroxílicos ou álcoois polioidroxílicos pelos ácidos livres de gordura, gorduras ou óleos da forma aqui descrita.

[0100] O substrato inicial ou substrato processado por meio de purificação pode ser misturado com álcoois monoidroxílicos ou álcoois polioidroxílicos antes do contato com o meio de purificação ou a enzima. O produto esterificado, transesterificado ou interesterificado pode ser formado a partir de esterificação, transesterificação ou interesterificação dos álcoois monoidroxílicos ou álcoois polioidroxílicos. Os álcoois monoidroxílicos ou os álcoois polioidroxílicos podem ser primários, secundários ou terciários álcoois de compostos de cadeia anular, reta ou ramificada. Os álcoois monoidroxílicos podem ser selecionados a partir de grupo que consiste em álcool metílico, álcool isopropílico, álcool alílico, etanol, propanol, n-butanol, iso-butanol, sec-butanol, terc-butanol, n-pentanol, isopentanol, n-hexanol, álcool hexadecílico ou álcool octadecílico. Os álcoois polioidroxílicos podem ser selecionados a partir de grupo que consiste em glicerol, propileno glicol, etileno glicol, 1,2-propanodiol e 1,3-propanodiol.

[0101] Exemplos de álcoois usados na presente abordagem incluem álcoois monoidroxílicos ou álcoois polioidroxílicos. Os álcoois monoidroxílicos podem ser primários, secundários ou terciários álcoois de compostos de cadeia anular, reta ou ramificada com um ou mais carbonos tais como álcool metílico, álcool isopropílico, álcool alílico, etanol, propanol, n-butanol, iso-butanol, sec-butanol, terc-butanol, n-pentanol, iso-pentanol, n-hexanol, álcool hexadecílico ou álcool octadecílico. O grupo hidroxila pode ser anexado a um anel aromático, tal como fenol. Exemplos de álcoois polioidroxílicos incluem glicerol, propileno glicol, etileno glicol, 1,2-propanodiol e 1,3-propanodiol.

[0102] Patente U.S. 5.219.733 indica outros álcoois usados para a presente abordagem. Estes álcoois incluem, mas sem limitações, 14-metilexadecanol-1, 16-metiloctadecanol-1, 18-metilnonadecanol, 18-metileicossanol, 20-metileneicossanol, 20-metildocossanol, 22-metiltricossanol, 22-metiltetracossanol, 24-metilpentacossanol-1 e 24-metilexacosanol.

[0103] Um ou mais tipos de meio de purificação e a enzima podem ser empacotados juntos ou separadamente em uma ou mais colunas através das quais o substrato inicial, o substrato processado por meio de purificação ou o produto esterificado, transesterificado ou interesterificado escoam. As colunas podem ser colunas encamisadas nas quais a temperatura de um ou mais do substrato inicial, o substrato processado por meio de purificação, um ou mais tipos de meio de purificação, a enzima ou o produto esterificado, transesterificado ou inte-

resterificado pode ser regulado. O substrato processado por meio de purificação pode ser preparado misturando o substrato inicial com um ou mais tipos de meio de purificação em um tanque para uma reação de purificação de lama em lotes ou misturando o substrato inicial em uma série de tanques para uma série de reações de purificação de lama em lotes. O substrato processado por meio de purificação pode ser separado a partir de um ou mais tipos de meio de purificação por meio de filtração, centrifugação ou concentração antes de reagir o substrato processado por meio de purificação com a enzima. Preferivelmente, o meio de purificação é mantido separado da enzima. Mantendo o meio de purificação separado da enzima, os constituintes de impureza do substrato inicial que degradam lipase não entram em contato com a lipase.

[0104] No método da presente abordagem, um ou mais tipos de meio de purificação e a lipase são empacotados em uma ou mais colunas. Em todas as modalidades, o meio de purificação é mantido separado de (isto é, não intermisturou com) a lipase ativa. Se tipos múltiplos de meio de purificação são usados, eles podem ser misturados juntamente e empacotados em uma coluna simples ou mantidos separados em diferentes colunas. Em uma modalidade alternativa, um ou mais tipos de meio de purificação são colocados sob um leito de lipase empacotadas dentro de uma coluna. Alternativamente, a lipase ativa pode ser mantida separada a partir de meio de purificação empacotando-a em sua própria coluna. Mais que um tipo de meio de purificação pode ser usado com propósitos de remover diferentes tipos de impurezas no substrato inicial. As colunas e

outros condutos de fluido podem ser encamisados de maneira a regular a temperatura do substrato inicial, o substrato processado por meio de purificação, o meio de purificação ou a enzima. O meio de purificação pode ser regenerado para uso repetido.

[0105] Também no método da presente abordagem, o substrato processado por meio de purificação é preparado misturando o substrato inicial com um ou mais tipos de meio de purificação em um tanque para um lama em lotes tipo purificação reação ou misturando o substrato inicial em uma série de tanques para uma série de reações do tipo lama em lotes de purificação. Nestas reações do tipo lama em lotes de purificação, os diferentes tipos de meio de purificação podem ser mantidos separados ou podem ser combinados. Após reagir com um tipo de meio de purificação (ou mistura específica de meio de purificação), o substrato inicial é separado a partir de meio de purificação (ou meios) por meio de filtração, centrifugação ou concentração. Após esta etapa de separação, o substrato inicial é adicionalmente purificado com outro meio de purificação ou serve como substrato processado por meio de purificação e reage com lipase. O substrato processado por meio de purificação preparado por este método de reação de purificação tipo lama em lotes pode reagir com lipase em um tanque para transesterificação ou esterificação tipo lama em lotes. Alternativamente, o substrato processado por meio de purificação pode ser forçado a escoar através de uma coluna de lipase. Os tanques de reação, colunas e outros condutos de fluido podem ser encamisados de maneira a regular a temperatura

do substrato inicial, o substrato processado por meio de purificação, o meio de purificação ou a enzima. Outras maneiras de regulagem da temperatura, tais como serpentinas de aquecimento/resfriamento ou ambientes controlados pela temperatura, são contemplados e bem conhecidos na técnica. O meio de purificação pode ser regenerado pelo uso repetido.

[0106] Atividade da lipase enzimática é também afetada por fatores tais como temperatura, luz e teor de umidade. Temperatura é controlada como descrito anteriormente. Luz pode ser mantida fora usando vários meios de bloquear ou filtrar a luz conhecidos na técnica. Teor de umidade, que inclui umidade atmosférica ambiente, é controlado operando o processo como um sistema fechado. Onde o processo inclui desodorização usando vapor como um agente removedor, o processo de desodorização pode ser mantido isolado a partir de enzima. Em função da desodorização ser realizada a alta temperatura e sob vácuo, teor de umidade no óleo desodorizado é muito baixo. Onde o processo de desodorização usa um gás inerte como o agente removedor, o processo de desodorização é opcionalmente mantido isolado a partir de enzima. Alternativamente, um leito de gás nitrogênio (ou outro gás inerte) pode ser colocado no topo do leito ou coluna contendo tanto meio de purificação quanto enzima. Estas técnicas têm o benefício adicionado de manter espécie oxidativa atmosférica (incluindo oxigênio) fora do substrato, produto ou enzima.

[0107] Lipase imobilizada pode ser misturada com substrato inicial ou substrato processado por meio de purificação para formar uma lama que é empacotada em uma coluna adequada. Al-

ternativamente, substrato ou substrato purificado pode escoar através de uma coluna de enzima pré-empacotada. A temperatura do substrato é regulada de maneira que ela possa escoar continuamente através da coluna para contato com a enzima de transesterificação ou esterificação. Se gorduras, óleos, triglicerídeos ou diglicerídeos sólidos ou muito viscosos são usados, o substrato é aquecido em um estado fluido ou menos viscoso. O substrato pode ser forçado a escoar através da coluna(s) sob a força de gravidade, usando uma bomba peristáltica ou pistão, sob a influência de uma bomba de sucção ou a vácuo, ou usando uma bomba centrífuga. As gorduras e óleos transesterificados produzidos são coletados e os glicerídeos desejados são separados a partir de mistura de reação produzidos por métodos bem conhecidos na técnica. Este método contínuo envolve uma probabilidade reduzida de permitir exposição dos substratos ao ar durante reação e tem então a vantagem de que os substratos não serão expostos a umidade ou espécie oxidativa. Alternativamente, tanques de reação para produção tipo lama em lotes como descrito anteriormente também podem ser usados. Preferivelmente, estes tanques de reação também são selados do ar de maneira a prevenir exposição ao oxigênio, umidade, ou outra espécie oxidante do ambiente.

[0108] O método da presente abordagem também compreende monitorar atividade enzimática medindo uma ou mais propriedades físicas do produto esterificado, transesterificado ou interesterificado; e opcionalmente ajustar o tempo de duração para que o substrato purificado faça contato com a lipase, ou ajustar a temperatura do substrato inicial, o substrato puri-

ficado, um ou mais tipos do meio de purificação ou a lipase em resposta a uma mudança na atividade enzimática, para produzir gorduras ou óleos tendo uma maior proporção substancialmente uniforme de esterificação, interesterificação, ou transesterificação com relação ao substrato inicial como medido pelas propriedades físicas. O tempo de duração para que o substrato purificado faça contato com a lipase pode ser ajustado ajustando a vazão de substrato purificado fornecido para contato com a lipase. Também, a quantidade e tipo de um ou mais tipos de meio de purificação pode ser ajustado em resposta a mudanças nas propriedades físicas das gorduras ou óleos para aumentar ou melhorar produtividade enzimática do lipase.

[0109] Pela frase "maior proporção substancialmente uniforme de esterificação, interesterificação, ou transesterificação com relação ao substrato inicial", deve-se entender que a quantidade ou grau de esterificação, interesterificação, ou transesterificação do óleo ou gordura produzidos de um substrato inicial particular pelos métodos da invenção varia não mais que cerca de 10%, preferivelmente não mais que cerca de 5% com medido por uma mudança em uma das medidas de propriedades físicas, a seguir.

[0110] Na presente abordagem, mudanças na atividade enzimática são monitoradas pelas seguintes mudanças nas propriedades físicas do produto. Como a atividade enzimática diminui, a taxa de conversão do substrato diminui de maneira que menos do substrato é convertido no produto por meio de esterificação, transesterificação ou interesterificação a uma va-

ção dada a quantidade inicial de conversão. Conseqüentemente, como a atividade enzimática decai, as propriedades físicas do produto progressivamente se parecem com as propriedades físicas dos componentes do substrato. Versados na técnica reconhecem que pelas seguintes mudanças nas propriedades físicas, os parâmetros do processo de produção esterificado, transesterificado ou interesterificado podem ser ajustados, aumentando assim a proporção do produto esterificado, transesterificado ou interesterificado com relação ao substrato, de maneira que gorduras e óleos com um grau de esterificação, interesterificação, ou transesterificação desejado possam ser produzidos enquanto melhora a produtividade enzimática do lipase.

[0111] Uma ou mais propriedades físicas do produto de gorduras ou óleos que pode ser medida durante os métodos da invenção incluem o ponto de gotejamento temperatura do produto, o perfil do teor de gordura sólida do produto, e mudanças em espectro ótico.

[0112] O ponto de gotejamento de Mettler (MDP) é um exemplo de uma propriedade física que pode ser medida para seguir mudanças na atividade enzimática. O MDP é determinado usando instrumentos de análise térmica de Mettler Toledo, Inc. (Columbus, OH) de acordo com o American Oil Chemists Society Official Method #Cc 18-80. O MDP é a temperatura na qual uma mistura de gorduras ou óleos torna-se fluido.

[0113] O perfil do teor de gordura sólida do produto (SFC) (em função de temperatura) é uma outra propriedade física usada para rastrear mudanças na atividade enzimática. SFC po-

de ser medido de acordo com American Oil Chemists Society Official Method #Cd 16b-93.

[0114] Acompanhar as mudanças no espectro ótico é um outro meio de monitorar mudanças na atividade enzimática. O substrato e produto cada qual tem um espectro ótico característico. Como a atividade da lipase decai, a quantidade de produto que deu origem aos sinais de espectroscópicos que podem ser atribuídos ao produto esterificado, transesterificado ou interesterificado (e que não podem ser atribuídos ao substrato) diminui.

[0115] Todas essas propriedades são medidas usando tecnologias bem conhecidas na técnica, e são usadas no acompanhamento de mudanças na atividade enzimática e para determinar a uniformidade de esterificação, interesterificação, ou transesterificação dos óleos ou gorduras produzidos.

[0116] Por exemplo, como a atividade da lipase enzimática decai, menos substrato é convertido no produto resultando em uma razão em peso maior substrato:produto. Esta razão em peso maior é manifestada em uma mudança de propriedades físicas do produto que escoam para fora tendendo em direção às propriedades físicas do substrato não esterificado ou não interesterificado. Para minimizar esta mudança, a vazão do substrato é reduzida de maneira que ela seja exposta por um longo período de tempo à lipase empacotada. A redução da vazão aumenta a razão em peso do produto: substrato e conseqüentemente as propriedades físicas das gorduras ou óleos que escoam para fora refletem a do o produto esterificado, transesterificado ou interesterificado desejado. Outros parâmetros do processo

que podem ser alterados incluem a vazão, temperatura ou pressão do substrato inicial ou o substrato processado por meio de purificação.

[0117] Onde substrato processado por meio de purificação reage com lipase em um tanque para produção tipo lama em lotes, mudanças nas propriedades físicas do produto também podem ser monitoradas como descrito anteriormente. Em um processo tipo lama em lotes, um tempo de duração otimizado é determinado para fazer contato com o substrato inicial com o meio de purificação (ou meios). Um tempo otimizado é também determinado para fazer contato com o substrato processado por meio de purificação com enzima.

[0118] Assim, modalidades da invenção envolvem monitorar atividade enzimática medindo uma ou mais propriedades físicas do produto após ter escoado através da lipase, ajustar vazão, tempo de residência da coluna, ou temperatura do substrato inicial, ou substrato processado por meio de purificação, e ajustar os parâmetros do processo ou a quantidade e tipo do meio de purificação em resposta a mudanças nas propriedades físicas a fim de aumentar ou melhorar a produtividade enzimática da lipase e/ou para aumentar a proporção de gorduras esterificadas, transesterificadas ou interesterificadas ou óleos no produto de maneira que gorduras e óleos com um grau de esterificação, interesterificação, ou transesterificação desejado possam ser produzidos, particularmente aqueles tendo uma maior proporção substancialmente uniforme de esterificação, interesterificação, ou transesterificação com relação ao substrato inicial.

[0119] O produto esterificado, transesterificado ou interesterificado pode ser submetido a processos de refinamento do óleo usual incluindo processo de refinamento, branqueamento, fracionamento, separação ou purificação, ou processo de desodorização adicional. O produto do processo presente pode ser separado de qualquer ácido graxo livre ou outros subprodutos refinando técnicas bem conhecidas na técnica. No caso de métodos tipo lama em lotes, o produto desejado pode ser separado usando um solvente adequado tal como hexano, removendo o material do ácido graxo com um álcali, desidratando e secando a camada do solvente, e removendo o solvente a partir da camada. O produto desejado pode ser purificado, por exemplo, por cromatografia de coluna. Os produtos desejados assim obtidos são usáveis para uma ampla variedade de aplicações culinárias.

[0120] Os exemplos seguintes mostram o efeito do pré-tratamento do substrato na produtividade da enzima.

EXEMPLOS

[0121] Os exemplos descritos a seguir mostram que a produtividade da transesterificação ou esterificação enzimática é bastante melhorada por purificação do óleo substrato. Os exemplos seguintes são somente ilustrativos e não devem limitar o escopo da invenção da forma definida pela reivindicação anexa.

EXEMPLO 1

[0122] O exemplo seguinte mostra o efeito do pré-tratamento de arginina do substrato na meia vida de lipase. Os três experimentos seguintes foram realizados neste exem-

plo: i) a atividade de lipase foi monitorada mediante exposição ao substrato que não foi submetido ao pré-tratamento de arginina ("controle"); ii) a atividade de lipase foi monitorada mediante exposição ao substrato que foi pré-tratado com arginina granular; e iii) a atividade de lipase foi monitorada mediante exposição ao substrato que foi pré-tratado com sílica revestida com arginina.

[0123] 9,4 g de enzima (TL IM de Novozimas A/S, Denmark) foram empacotadas em uma coluna encamisada de 1,5 cm de diâmetro (30 cm comprimento) a uma altura de 11,8 cm, que deu 20,8 mL de volume do leito da enzima. A água circulante através da camisa de coluna foi mantida a 70°C. A bomba do pistão e linhas de alimentação foram envoltas com fita de aquecimento e coberta com insolação para impedir qualquer solidificação do substrato.

[0124] Os materiais de pré-tratamento (isto é, meio de purificação) foram testados como pré-colunas de óleo adicionado 1,5 vezes o volume do leito de material de pré-tratamento para a coluna no topo da lipase imobilizada. Para o controle, somente enzima foi empacotada na coluna sem nenhuma pré-coluna no topo. Arginina granular foi adquirida de Sigma Chemical (St Louis, Mo), e usada sem nenhuma modificação adicional para testar o efeito de arginina granular. Sílica revestida de arginina foi preparada dissolvendo arginina granular em água deionizada a 50°C antes da adição de sílica gel (Davisil grau 636 da Aldrich Chemical). Após misturar a solução de sílica gel-arginina por 15 minutos, o líquido foi separado a partir de sílica gel filtrando através de um papel de fil-

tro de grau médio sob baixa pressão. A sílica gel úmida coberta foi seca em um forno a 70°C por toda a noite.

[0125] Substrato do óleo foi feito com óleo de fava de soja refinado, branqueado (RB), que formou a porção líquida de óleo no substrato, e óleo de fava de soja totalmente hidrogenado, que fez a gordura sólida no substrato. Uma mistura de substrato de óleo de fava soja RB e óleo de fava de soja totalmente hidrogenado (80/20 por peso) foi preparada e introduzida no topo da coluna usando uma bomba de pistão para alimentar substrato.

[0126] A extensão de reação da enzima foi monitorada pela mudança de propriedades de fusão do substrato e produtos, medida por ponto de gota de Mettler (MDP) como revelado no pedido de patente U.S. 2003/0054509 A1. A mistura de substrato foi bombeada para a coluna a uma taxa que deu o ponto de gota de Mettler desejado (105-107°F) do óleo produto saindo da coluna de lipase, e a taxa de bombeamento foi ajustada durante testes para compensar a perda de atividade da lipase. Figura I mostra o ajuste da taxa de bombeamentos para substrato não tratado (círculos abertos), substrato tratado com arginina granular (círculos fechados), ou substrato tratado com sílica revestida de arginina (losangos fechados).

[0127] Os resultados na Figura 1 são sumarizados na Tabela 1 que mostra as meias vidas e produtividades da lipase expostas a substrato não tratado ou tratado com arginina. A primeira meia vida for cada caso foi determinada quando a taxa de bombeamento foi reduzida pela metade da taxa de bombeamento inicial. Produtividade foi determinada dividindo as quan-

tidades totais do produto feito durante a primeira meia vida pela quantidade de enzima (9,4 g).

[0128] Tabela 1. Efeito do pré-tratamento de Arginina na meia vida produtividade da enzima TL IM e

Tratamento	Meia vida (dias)	Produtividade (g de óleo/g de enzima)
Controle	13	1220
Arginina Granular	15	1451
Sílica revestida de arginina	62	5000

[0129] A primeira meia vida do controle foi 13 dias, dando uma produtividade de 1220 g de óleo/g enzima. Esta perda da atividade inicial é muito típica para lipases imobilizadas usadas desta maneira. Controle não mostra o efeito de proteção inicial, que os tratamentos de arginina demonstram. A arginina granular preservou a atividade da enzima inicial pelos primeiros 8 dias, e então sucedeu-se uma queda rápida. Meia vida e produtividade foram melhoradas pelo tratamento de arginina granular. Substrato pré-tratamento com sílica revestida de arginina impediu a perda de atividade da enzima pelos primeiros 20 dias antes de mostrar um sinal de declínio da atividade da lipase. A meia vida e produtividade de pré-tratamento com sílica revestida de arginina é maior que quatro vezes que a do controle.

[0130] Estes experimentos mostram que arginina granular melhora significativamente a meia vida de lipase TL IM. Uma melhora ainda maior na meia vida de lipase TL IM é demonstrada quando sílica revestida de arginina gel é usada como o

meio de purificação. Acredita-se que esta melhora maior na meia vida é pelo fato de que sílica revestida de arginina ter maior área da superfície do que arginina granular.

EXEMPLO 2

[0131] Outros aminoácidos foram testados por sua capacidade para aumentar a meia vida de lipase. Preparações da sílica revestida de aminoácido e condições para operação da coluna foram as mesmas descritas no Exemplo 1. A extensão de reação da enzima foi monitorada pela mudança de propriedades de fusão do substrato e produtos, medidas por ponto de gota de Mettler (MDP) como revelado na Pedido de publicação U.S. No. 200310054509 A1. A mistura de substrato foi bombeada para a coluna em uma taxa que deu o ponto de gota de Mettler desejado (105 - 407°F) de óleo do produto saindo a coluna de lipase, e a taxa de bombeamento foi ajustada durante testes para compensar a perda de atividade da lipase.

[0132] Figura 2 mostra o ajuste da taxa de bombeamento para substrato tratado com sílica revestida de arginina (losangos fechados), sílica revestida com lisina (círculos abertos), sílica revestida com histidina (triângulos fechados), e sílica revestida com cisteína (estrelas "*"). Os dados de Figura 2 são sumarizados na Tabela 2.

[0133] Tabela 2: Efeito do pré-tratamento de arginina, Lisina, Histidina ou Cisteína na meia vida e produtividade da enzima TL IM rrr

Tratamento	Meia vida (dias)	Produtividade
Arginina		
Sílica em Lisina	62	5000

Sílica em Histidina	50	4631
Sílica em Cisteína	15	1520

[0134] Efeito de proteção significativo foi obtido com lisina e histina em sílica. Cisteína forneceu um pequeno efeito de proteção na meia vida de lipase (15 dias) com relação ao controle (13 dias)

EXEMPLO 3

[0135] 9,4 g de enzima (TL IM de Novozimas) foi empacotado em uma coluna encamisada de 1,5 cm de diâmetro (30 cm de comprimento) a uma altura de 11,8 cm, que deu um volume de leito da enzima de 20,8. A água circulante através da camisa de coluna foi mantida a 70°C. A mistura do substrato de óleo de fava de soja e óleo de fava de soja hidrogenado (80/20 por peso) foi preparada e introduzida no topo da coluna usando uma bomba HPLC no substrato de alimento. A bomba HPLC e as linhas de alimento foram envoltas com fita de aquecimento e cobertas com isolante para impedir qualquer solidificação do substrato. A extensão de reação da enzima foi monitorada pela mudança de propriedades de fusão do substrato e produtos, medidas por ponto de gota de Mettler (MDP) como revelado no Pedido de publicação U.S. No. 2003/0054509 A1. A mistura de substrato foi bombeada para a coluna em uma taxa que deu o ponto de gota de Mettler desejado (105 - 107°F) de óleo saindo da coluna, e a taxa de bombeamento foi ajustada durante testes para compensar a perda de atividade da lipase.

[0136] Substrato do óleo foi feito em alguns casos com óleo de fava de soja refinado, branqueado, desodorizado (RBD), que é equivalente ao produto de comércio. Em alguns

casos, substrato do óleo foi feito com óleo que foi somente submetido a refinamento e branqueamento do óleo (RB). O último óleo forma um substrato preferido a partir de ponto de vista de custo do processo. Estes óleos formam a porção líquida do óleo no substrato na Tabela 3.

[0137] Tabela 3. Exemplos comparativos. Todos óleos substrato contiveram 20% do óleo de fava de soja totalmente hidrogenado e 80% do óleo indicado na tabela.

Material da pré-coluna	Óleo líquido	Meia vida de lipase (dias)	Produtividade g de óleo/g de enzima
Nenhum	soja RB	6	462,4
Nenhum	soja RBD	8	681,9
Nenhum	soja RBD (repetido)	8	798,4
Nenhum	soja RBD, temperatura da coluna 80°C	7	423,3
Nenhum	soja RBD, temperatura da coluna 90°C	7	618,4
Nenhum	Soja RBD (óleo do substrato ré-desodorizado recentemente)	10	786,4

[0138] Meia vida da enzima usando substrato feito com óleo RBD na média de 8 dias, e foi somente 6 dias usando substrato feito com soja RB. Ré-desodorizando a mistura de soja RBD e óleo de soja totalmente hidrogenado a meia vida foi estendida para 10 dias.

EXEMPLO 4

[0139] Os testes da Tabela 4 foram conduzidos como no Exemplo 3 a 70°C, e materiais foram testados como pré-colunas de óleo adicionando um volume igual do leite de material à coluna no topo da lipase imobilizada. A extensão de reação da enzima foi monitorada pela mudança de propriedades de fusão do substrato e produtos, medida pelo ponto de gota de Mettler (MDP) como revelado no Pedido de Publicação U.S. No. 2003/0054509 A1. A mistura de substrato foi bombeada para a coluna em uma taxa que deu o ponto de gota de Mettler desejado (105-107°F) do óleo do produto saindo da coluna de lipase, e a taxa de bombeamento foi ajustada durante testes para compensar a perda de atividade da lipase.

[0140] Tabela 4

Material da pré-coluna	Óleo líquido	Meia vida da lipase (dias)	Produtividade de g de óleo/g de enzima
0,2% de vitri- to de sódio	soja RB	1	103,2
Glúten de mi- lho	soja RBD	3	257,9
Lisina Granu- lar	soja RBD	5	304,9
Sacarose	soja RBD	5	530
Citrato de só- dio anidro	soja RBD	5	NA
Silicato de magnésio	soja RBD	6	398,6
Glicose	soja RBD	6	490
Massa celular	soja RBD	6	469

de Rhizopus			
Lipase* TL IM		8	798,4
usada	soja RBD		

* Lipase TL IM usada é a enzima que foi previamente usada em reações de interesterificação idênticas até a atividade ser esgotada.

EXEMPLO 5

[0141] Resinas de troca iônica foram testadas como pré-colunas (Tabela 5); os testes foram conduzidos de outra forma a 70°C como no Exemplo 3. Para fazer uma mistura ré-desodorizado, óleo de fava de soja totalmente hidrogenado foi fundido no óleo RBD de soja e a mistura fundida foi desodorizada sob condições padrões de refinamento de óleo comestível. A extensão de reação da enzima foi monitorada pela mudança de propriedades de fusão do substrato e produtos, medida pelo ponto de gota de Mettler (MDP) como revelado em Pedido de publicação U.S. No. 2003/0054509 A1. A mistura de substrato foi bombeada para a coluna em uma taxa que deu o ponto de gota de Mettler desejado (105-107°F) de óleo do produto saindo da coluna de lipase, e a taxa de bombeamento foi ajustada durante testes para compensar a perda de atividade da lipase.

[0142] Tabela 5

Resina de pré-coluna	Óleo líquido	Meia vida de lipase (dias)	Produtividade g de óleo/g de enzima
EXC04	soja RBD, ré-desodorizado	9	861,9
Rohm & Haas A-7*	soja RBD	8	825,2

Rohm & Haas A 7, seco**	soja RBD	16	1478,3
----------------------------	----------	----	--------

* A resina de troca iônica foi seca a 110°C por 2 horas.

**A resina de troca iônica foi seca em etanol e o etanol foi removido antes do uso.

[0143] Quando resina Rohm & Haas A-7 foi seca com etanol antes do uso, um aumento na meia vida de lipase e produtividade foi notado.

EXEMPLO 6

[0144] Materiais contendo proteína e um aminoácido foram testados como pré-colunas (Tabela 6); os testes foram conduzidos de outra forma a 70°C como no Exemplo 3. A proteína vegetal texturizada particular usada foi proteína vegetal texturizada da marca TVP® de Archer Daniels-Midland Company, código do produto 165 840 (grânulos de 1/16 polegadas), com um teor de umidade da forma recebida de 6%. A extensão de reação da enzima foi monitorada pela mudança de propriedades de fusão do substrato e produtos, medida pelo ponto de gota de Mettler (NIDP) como revelado em Pedido de publicação U.S. No. 200310054509 A1. A mistura de substrato foi bombeada para a coluna em uma taxa que deu o ponto de gota de Mettler desejado (105-107°F) de óleo do produto saindo da coluna de lipase, e a taxa de bombeamento foi ajustada durante testes para compensar a perda de atividade da lipase.

[0145] Tabela 6

Material da pré-coluna	Óleo líquido	Meia vida de lipase (dias)	Produtividade g de óleo/g de enzima
------------------------	--------------	----------------------------------	---

Arginina	Soja RB	13	1242,1
Lipase TL IM Submetida a autoclave	Soja RBD, ré-desodorizado	15	1119,1
Proteína vegetal texturizada da marca TVP® da forma recebida	Soja RB com 200 ppm TBHQ, borrifamento de nitrogênio	16	1531,2
Proteína vegetal texturizada da marca TVP® seca no forno por toda a noite a 70-80°C	Soja RB	17	1587,1
Proteína vegetal texturizada da marca TVP® da forma recebida (repetida)	Soja RB com 200 ppm TBHQ, borrifamento de nitrogênio	18	1341,8
Proteína vegetal texturizada da marca TVP® da forma recebida	Soja RBD, ré-desodorizado, coberta	>18	1644,8
Proteína vegetal texturizada da marca TVP® seca no forno por toda a noite a 70-80°C	Soja RBD com 200 ppm TBHQ, borrifamento de nitrogênio	42	3340,1

[0146] Quando secos por toda a noite a 70-80°C antes do uso, um aumento da meia vida de lipase e produtividade foi notado.

EXEMPLO 7

[0147] Uma reação de interesterificação na escala de produção foi realizada usando proteína vegetal texturizada da marca TVP® de Archer-Daniels-Midland Company como meio de pu-

rificação. Um lote de TVP® tendo código do produto 165 840 (grânulos de 1/16 polegadas) foi seco em um secador de correias a 275°F durante a fabricação para um teor de umidade final de 2%. O TVP® seco foi empacotado em duas colunas do meio de purificação (12 polegadas de diâmetro e 46 polegadas de altura, 87,5 lb TVP® por coluna). Lipase (TL IM Novozima, 240 lb) foi empacotada em uma coluna de reator aquecido (2-ft de diâmetro e 5-ft de altura).

[0148] Óleo de alimentação (uma mistura compreende 80 partes óleo de fava de soja desodorizado refinadas, branqueadas, de e 20 partes de óleo de fava de soja totalmente hidrogenado) foi misturado e aquecido a 70°C para assegurar fusão total do óleo de fava de soja hidrogenado e completa mistura dos componentes do óleo de alimentação. O óleo de alimentação foi bombeado através do meio de colunas de purificação da base do topo em série antes de entrar na base da coluna do reator aquecida a uma vazão inicial de cerca de 4 gal/min. óleo interesterificado saiu do topo da coluna de reator aquecida como produto. A vazão do óleo de alimentação foi reduzida como a atividade da enzima diminuiu lentamente para fornecer o produto tendo propriedades de fusão consistentes. A extensão de reação da enzima foi monitorada pela mudança de propriedades de fusão do substrato e produtos, medida pelo ponto de gota de Mettler (MDP) como revelado no Pedido de publicação U.S. No. 2003/0054509 A1. A mistura de substrato foi bombeada para a coluna em uma taxa que deu o ponto de gota de Mettler desejado (105-107°F) de óleo do produto saindo da coluna de lipase, e a taxa de bombeamento foi ajustada durante testes

para compensar a perda de atividade da lipase. A temperatura da coluna de reator aquecida foi mantida a 70°C.

[0149] A lipase produziu 994,800 libras de óleo interesterificado tendo propriedades de fusão satisfatórias (ponto de gota de Mettler 105-107°F), de maneira que a produtividade da lipase foi 4,145 g de óleo/g de enzima.

[0150] Embora a invenção anterior tenha sido descrita com certo detalhe com o propósito de esclarecimento e entendimento, versados na técnica perceberão na leitura desta revelação que várias mudanças na forma e detalhe podem ser feitas sem fugir do escopo da invenção e reivindicação anexa. Todos os pedidos de patente supramencionados são por meio desta incorporados na sua íntegra pela referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir gorduras ou óleos **CARACTERIZADO** por compreender:

colocar um substrato inicial compreendendo gorduras ou óleos em contato com uma ou mais proteínas vegetais texturizadas para gerar um substrato purificado; e

colocar o substrato purificado em contato com lipase para efetuar esterificação, interesterificação ou transesterificação, criando as gorduras ou óleos e recuperando as gorduras ou óleos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da proteína vegetal texturizada ser uma proteína de soja texturizada.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da proteína vegetal texturizada ter um teor de umidade menor que 5%.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato do teor de umidade da proteína vegetal ser de 2% a 4%.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do substrato inicial ainda compreender qualquer um dentre ácidos graxos livres, álcoois monohidroxílicos, álcoois polihidroxílicos, ésteres ou combinações destes.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato das gorduras ou dos óleos compreenderem qualquer um dentre:

(i) gordura de manteiga, manteiga de cacau, substi-

tutos de manteiga de cacau, gordura de ilipê, manteiga de *kokum*, gordura de leite, gordura *mowrah*, manteiga *phulwara*, gordura sal, gordura de karité, sebo de bornéu, banha de porco, lanolina, gordura de boi, gordura de carneiro, sebo, gordura animal, óleo de canola, óleo de rícino, óleo de coco, óleo de coentro, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de avelã, óleo de cânhamo, óleo de pinhão manso (*jatropha*), óleo de semente de linho, óleo de semente de manga, óleo de limnanto (*meadowfoam*), óleo de mostarda, óleo de mocotó, óleo de oliva, óleo de palmeira, óleo de semente de palma, óleo de amendoim, óleo de semente de colza, óleo de farelo de arroz, óleo de açafroa, óleo de sasanqua, manteiga de karité, óleo de soja, óleo de semente de girassol, óleo de pinho, óleo de tsubaki, óleos vegetais, óleos marinhos que podem ser convertidos em gorduras plásticas, óleos marinhos que podem ser convertidos em gorduras sólidas, óleo de peixe, óleo de peixe-carvão do Pacífico, óleo de fígado de bacalhau, óleo de peixe olho-de-vidro laranja, óleo *pileherd*, óleo de sardinha, óleos de baleia, óleos de arenque, 1,3-dipalmitoil-2-monooleína (POP), 1(3) palmitoil-3(1)-estearoil-2-monooleína(POST), 1,3-diestearoil-2-monooleína (StOSt), triglicerídeo, diglicerídeo, monoglicerídeo, triglicerídeo do ácido beênico, trioieína, tripalmitina, tristearina, oleína de palma, estearina de palma, oleína de semente de palma, estearina de semente de palma, glicerídeos de ácidos graxos de cadeia média;

(ii) óleos parcialmente hidrogenados processados de (i);

(iii) óleos totalmente hidrogenados processados de (i); ou

(iv) óleos fracionados de (i).

7. Método, de acordo com a reivindicação 5, **CARACTERIZADO** pelo fato dos ésteres compreenderem qualquer um dentre ésteres de cera, ésteres de alquila, ésteres de metila, ésteres de etila, ésteres de isopropila, ésteres de octadecila, ésteres de arila, ésteres de propileno glicol, ésteres de etileno glicol, ésteres de 1,2-propanodiol ou ésteres de 1,3-propanodiol.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do substrato inicial ainda compreender um ou mais ácidos graxos.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da proteína vegetal texturizada e da lipase serem empacotadas em uma ou mais colunas.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato do substrato purificado ser preparado misturando-se o substrato inicial com a proteína vegetal texturizada em um tanque para uma reação de purificação de lama em batelada ou misturando-se o substrato inicial em uma série de tanques para uma série de reações de purificação de lama em batelada.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** por ainda compreender misturar o substrato purificado com a lipase em um tanque para uma reação de lama em batelada, ou escoar o substrato purificado através de uma coluna contendo a lipase.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da lipase ser uma lipase 1,3-seletiva.

13. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da lipase não ser uma lipase seletiva.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** por ainda compreender:

monitorar a atividade enzimática medindo-se uma ou mais propriedades físicas das gorduras ou óleos após ter entrado em contato com a lipase; e

ajustar o tempo de duração para que o substrato purificado faça contato com a lipase, ou ajustar a temperatura do substrato inicial, do substrato purificado, da proteína vegetal texturizada ou da lipase em resposta a uma mudança na atividade enzimática para produzir gorduras ou óleos tendo uma maior proporção substancialmente uniforme de esterificação, interesterificação ou transesterificação com relação ao substrato inicial.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** por ainda compreender:

ajustar a quantidade e tipo da proteína vegetal em resposta a mudanças nas propriedades físicas das gorduras ou óleos para aumentar a produtividade enzimática da lipase.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato das gorduras ou óleos produzidos serem 1,3-diglicerídeos.

17. Método, de acordo com a reivindicação 1,

CARACTERIZADO pelo fato das gorduras ou óleos compreenderem óleo de soja parcialmente hidrogenado, óleo de milho parcialmente hidrogenado, óleo de semente de algodão parcialmente hidrogenado, óleo de soja totalmente hidrogenado, óleo de milho totalmente hidrogenado, óleo de semente de algodão totalmente hidrogenado, óleo de palma parcialmente hidrogenado, óleo de semente de palma parcialmente hidrogenado, óleo de palma totalmente hidrogenado, óleo de semente de palma totalmente hidrogenado, óleo de palma fracionado, óleo de semente de palma fracionado, óleo de palma fracionado parcialmente hidrogenado ou óleo de semente de palma fracionado parcialmente hidrogenado.

18. Método, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato da meia-vida da atividade enzimática da lipase resultante do contato com o substrato purificado ser mais que 2,5 vezes maior que a meia-vida da atividade enzimática resultante do contato da lipase com o substrato inicial.

Figura 1. Efeito da arginina na estabilidade enzimática

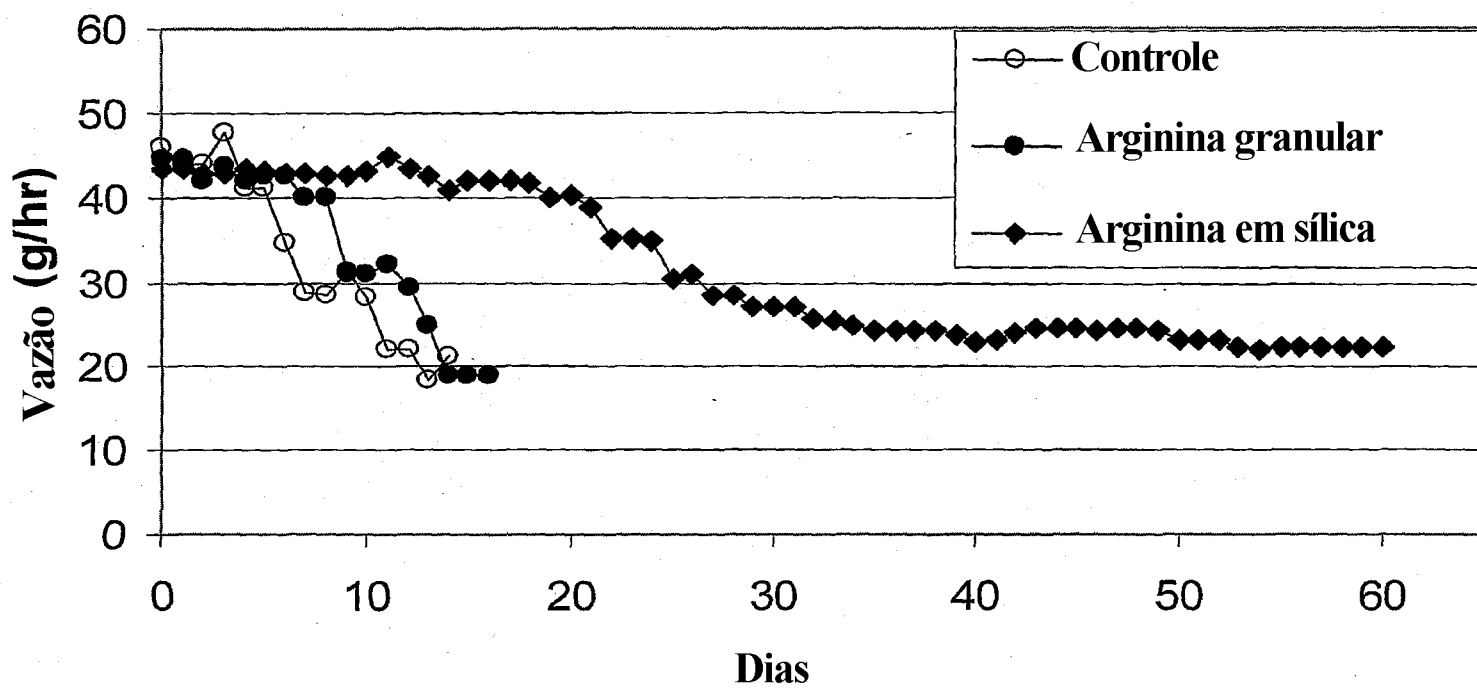


Figura 2. Efeito de aminoácidos na estabilidade de enzimas

