

(11) *Número de Publicação:* PT 739985 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C12P009/00 A C12N011/18 B
A23D007/01 B A23J007/00 B
A23L001/24 B

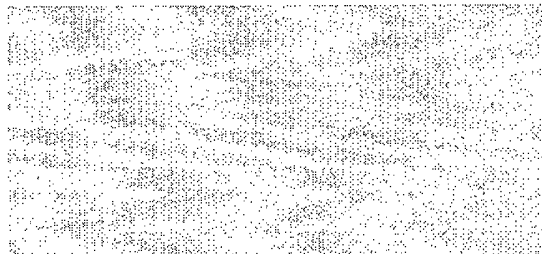
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1996.03.27</p> <p>(30) <i>Prioridade:</i> 1995.04.24 US 427544</p> <p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1996.10.30</p> <p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.11.15</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> SOCIETE DES PRODUITS NESTLÉ S.A. CASE POSTALE 353 CH-1800 VEVEY CH</p> <p>(72) <i>Inventor(es):</i> HELMUT TRAITLER CH OLIVER CHMIEL CH NICHOLAS MELACHOURIS CH</p> <p>(74) <i>Mandatário(s):</i> JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT</p>
--	--

(54) *Epígrafe:* PROCESSO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE FOSFOLÍPIDOS

(57) *Resumo:*

PROCESSO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE FOSFOLÍPIDOS



f l A

DESCRIÇÃO

“PROCESSO DE INTERESTERIFICAÇÃO DE FOSFOLÍPIDOS”

A presente invenção tem por objecto um processo para trocar grupos acilo num fosfolípido por troca enzimática do éster com um triacil-glicerol.

Os glicerofosfolípidos, tais como a fosfatidil-colina, são um glicerol esterificado com dois grupos acilo de ácido gordo e um grupo fosfato ou fosfato esterificado. Para determinadas aplicações dos fosfolípidos é desejável trocar os grupos acilo presentes nos fosfolípidos para melhorar, por exemplo, a sua estabilidade térmica.

A propósito deste assunto demonstrou-se já, por exemplo, no documento US-A-5 314 706, que a gema de ovo aditivada com liso-fosfatidil-colina exógena, obtida por hidrólise da lecitina com uma fosfolipase A2, melhorou a termostabilidade de emulsões, em particular da maionese.

Além disso, demonstrou-se também, conforme descrito no documento WO 91/03564, que a interesterificação enzimática de um fosfolípido com um ácido gordo, por meio de um catalisador constituído por uma lipase imobilizada sobre um suporte macroporoso num solvente orgânico, provocou uma melhor incorporação de grupos acilo específicos no fosfolípido. De acordo com esse processo, utilizou-se um grande excesso de ácidos gordos, o qual persiste na mistura de reacção no final da execução do processo e que não é facilmente separado da lecitina modificada pretendida.

Nas páginas 181 a 194 do volume 9 da obra “Biocatalysis” de 1994 vem descrito, entre outros, um processo de transesterificação de fosfolípidos, o qual consiste em trocar determinados ácidos gordos do fosfolípido por ácidos gordos livres, por meio de uma lipólise enzimática em presença de uma lipase ou de uma fosfolipase imobilizada. No último parágrafo da página 190 é abordada a transesterificação de um fosfolípido sintético que contém dois resíduos de ácido mirístico, em presença de um grande excesso de ácido oleico, comparativamente com o substrato fosfolipídico, por meio de uma lipase (liposima ou lipase de *A. niger*) na ausência de solvente e em

f l A

presença de 5% de água (linhas 2 a 8). Ali se indica mais adiante que a fosfolipase é inactiva na reacção de transesterificação sem solvente (linhas 11 e 12). Na passagem que faz a ligação das páginas 190 e 191 está explícito que se produz um grau importante de hidrólise em simultaneidade com a transesterificação. Se a transesterificação permuta os ácidos gordos, é evidente que a hidrólise liberta uma quantidade suplementar de ácidos gordos que vai juntar-se ao excesso utilizado no processo. Em conclusão, os autores sugerem que a transesterificação deve ser efectuada preferencialmente por meio de lipase em presença de água e também de um grande excesso de ácido gordo.

Constitui um objecto da presente invenção modificar a composição em ácidos gordos dos fosfolípidos para substituir os ácidos gordos insaturados de cadeia longa por ácidos gordos de cadeia curta e de cadeia média.

De uma forma completamente inesperada concluiu-se agora que é possível efectuar a interesterificação de triglicéridos com fosfolípidos em presença de uma lipase imobilizada e de uma fosfolipase imobilizada, de modo a incorporar grupos ácidos gordos de cadeia curta nas posições 1 e 2 do grupo glicerol. Em nenhum momento durante a reacção foi detectado qualquer aumento significativo da quantidade de ácidos gordos livres. Por outro lado, era imprevisível que a lecitina modificada fosse um emulsionante melhor do que a lecitina natural para determinadas formulações de emulsões tais como, por exemplo, a maionese e os temperos para saladas. Além disso, a humectabilidade dos pós, em particular os pós de leite e de cacau enriquecidos com lecitina, foi consideravelmente melhorada a partir do momento em que foi utilizada lecitina modificada em conformidade com o processo da presente invenção. Outra vantagem decisiva das lecitinas modificadas, obtidas pelo processo da presente invenção, é a ausência de qualquer sabor desagradável.

O processo de acordo com a presente invenção caracteriza-se pelo facto de a reacção se efectuar na ausência de solvente, com um sistema enzimático constituído por uma mistura de uma lipase imobilizada e de uma fosfolipase imobilizada e pelo facto de o triacil-glicerol conter grupos acilo saturados de cadeia curta em C₂ a

C₄ e/ou de cadeia média em C₆ a C₁₂.

O processo da presente invenção pode ser aplicado a qualquer tipo desejado de fosfolípidos que contenham grupos éster de função acilo de ácidos gordos. Como exemplos de tais fosfolípidos naturais refere-se os seleccionados entre ácido fosfatídico, fosfatidil-colina, fosfatidil-serina, fosfatidil-glicerol, fosfatidil-inositol, fosfatidil-etanolamina e difosfatidil-glicerol. Também é possível tratar fosfolípidos sintéticos com diversos compostos hidroxílicos esterificados no grupo fosfato, os 1-alkil-2-acil-fosfolípidos e os diacil-fosfolípidos.

A reacção de permuta pode ser utilizada para incorporar no fosfolípido o grupo ácido gordo desejado. Os grupos visados são ácidos gordos saturados de cadeia curta em C₂ a C₄ e os grupos ácidos gordos saturados de cadeia média em C₆ a C₁₂. Todos os óleos e substâncias gordas que contenham uma quantidade importante destes grupos ácidos gordos, incorporada em triglicéridos, designadamente triglicéridos de cadeia curta, de cadeia média e um óleo de manteiga, de preferência a triacetina, podem ser utilizados como matérias primas.

O catalisador enzimático utilizado compreende uma lipase que pode ser de origem animal, vegetal ou microbiana e que pode ser não específica ou específica do ponto de vista da posição, por exemplo, 'Lypozyme (TM), Novo Nordisk a/s'. O catalisador compreende também uma fosfolipase, de preferência uma fosfolipase extracelular A2, por exemplo, 'Lecitase (TM), Novo Nordisk a/s'.

As enzimas utilizadas no processo da presente invenção são imobilizadas sobre um suporte orgânico ou inorgânico macroporoso sob a forma de partículas e são fixadas, de preferência, ao suporte por reticulação com qualquer agente de reticulação conveniente, por exemplo, o glutaraldeído.

A relação entre a lipase imobilizada e a fosfolipase imobilizada é escolhida de tal modo que a lipase represente entre 25% e 75% e de preferência entre 30% e 70% em peso da quantidade total por esférulas de enzima, o que corresponde também à mesma percentagem de actividade total do sistema enzimático.

O processo de interesterificação deve ser praticado em condições tais que seja obtida uma actividade e uma termostabilidade das enzimas immobilizadas, vantajosamente a uma temperatura entre 60°C e 80°C durante um período compreendido entre 1 e 72 horas e de preferência durante cerca de 23 horas. No final da reacção as enzimas são separadas, por exemplo, por filtração. Uma vantagem do processo da presente invenção consiste na possibilidade, se isso for necessário, de separar facilmente os fosfolípidos dos triglicéridos, em particular no caso em que se utiliza a triacetina como óleo, uma vez que se produz uma separação imediata de fases entre a triacetina que não tenha reagido e a lecitina.

No caso de se utilizar qualquer outro triglicérido, e na hipótese de se pretender uma separação de fases, é possível recorrer aos processos clássicos de purificação da lecitina, tais como fraccionamento por meio de acetona ou por eliminação da goma, por exemplo, com ácido fosfórico a cerca de 0,3% e a uma temperatura de cerca de 90°C. A título de variante que não é preferencial, é possível efectuar a separação por cromatografia de camada fina com elevados rendimento (CCFER).

As lecitinas modificadas obtidas pelo processo da presente invenção podem ser utilizadas em emulsões alimentares, por exemplo, em molhos, na maionese e em temperos para saladas, e são notáveis devido às suas melhores propriedades de emulsificação e também devido à estabilidade térmica dos produtos onde são incorporadas.

Também podem ser utilizadas para a produção de pós de dissolução instantânea, por exemplo, pós de leite, cacau e café, aos quais conferem uma humectabilidade melhor do que a conferida pelas lecitinas vulgares.

Ilustra-se a presente invenção mais minuciosamente por meio dos exemplos a seguir descritos, nos quais todas as partes e percentagens são expressas em peso, salvo quando especificado de outro modo.

Nos exemplos a lipase immobilizada que foi utilizada era 'Lipozyme (TM), Novo Nordisk a/s'.

A fosfolipase immobilizada que foi utilizada era uma fosfolipase extracelular A2 immobilizada sobre esférulas de vidro e preparada conforme a seguir se descreve.

f. l. A

Colocou-se uma quantidade de 0,5 g de esférulas de vidro (aminopropiladas, Sigma G-5019) em 5 mL de uma solução tampão de NaH_2PO_4 100 μM , desgaseificada (pH 7), contendo 2,5% de glutaraldeído, e aplicou-se uma pressão hipobárica durante 1 hora. Efectuou-se a lavagem sequencial das esférulas, primeiro com água e depois com uma solução 0,5 M de NaCl e uma solução 100 mL de NaH_2PO_4 (pH 6). Acrescentou-se às esférulas 1 mL de 'Lecitase (TM), Novo Nordisk a/s' e 4 mL desse último tampão desgaseificado e depois manteve-se a mistura a incubar a 4°C de um dia para o outro, sob agitação ligeira. Após nova lavagem com esse último tampão, as esférulas foram então guardadas em tampão de armazenagem.

Exemplo 1

Preparou-se e aqueceu-se a 70°C uma quantidade de 150 g de uma mistura de lecitina desumidificada: triglicéridos de cadeia média, numa proporção igual a 1:2. A seguir juntou-se uma quantidade de 1,5 g de 'Lipozyme (TM)' imobilizada e 0,3 g de fosfolipase A2 imobilizada. Manteve-se esta amostra a incubar a essa temperatura durante 23 horas. Efectuou-se a recuperação das enzimas por filtração. Para efeitos de análise, os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAMES) foram produzidos a partir dos fosfolípidos mediante a adição de 400 μL de cloreto de acetilo (Fluka) e realizando uma incubação durante 20 minutos a 100°C. Os fosfolípidos foram então separados de todos os outros constituintes por CCFER (placas de gel de sílica F 254 da Merk) num passo em que houve duas migrações, a primeira com uma mistura de tolueno:hexano:ácido fórmico numa proporção igual a 70:30:0,5 e depois com uma mistura de hexano:éter dietílico: ácido fórmico numa proporção igual a 60:40:1, tendo sido extraídos do gel de sílica em 2 mL de uma mistura de hexano:metanol numa proporção igual a 1:4.

Os FAMES obtidos com a lecitina de partida e com a lecitina modificada em conformidade com o processo da presente invenção foram analisados por cromatografia em fase gasosa. Os valores indicados no quadro 1 subsequente baseiam-se no peso dos ácidos gordos.

f. l. a.

QUADRO 1

Ácido gordo	Lecitina de partida	Lecitina modificada
C 4:0	-	-
C 6:0	-	-
C 8:0	-	18,4
C 10:0	0,1	9,1
C 12:0	-	-
C 14:0	1,8	1,5
C 16:0	17,7	21,4
C 18:0	5,9	4,1
C 18:1	11,1	4,6
C 18:2	57	35,7
C 18:3	6,6	4,5

Para efeitos de comparação tratou-se a mesma lecitina com a 'Lecitase (TM)' imobilizada (comparação 1) ou com 'Lipozyme (TM)' imobilizada (comparação 2). A quantidade de ácidos gordos novos incorporados era igual a 18% molar para a comparação 1 e igual a 27% molar para a comparação 2, ao passo que era igual a 45% molar para a lecitina modificada com a mistura de enzimas no processo da presente invenção.

Exemplo 2

Utilizou-se o processo do exemplo 1, com a excepção de se ter submetido a lecitina a uma reacção com a triacetina. A proporção entre lecitina desumidificada:triacetina era igual a 1:1. Deixou-se as amostras em repouso de uma dia para o outro para que tivesse lugar uma separação de fases praticamente total. Recuperou-se a enzima por filtração. Analisou-se a fase superior, que representava a lecitina, para se determinar a composição em ácidos gordos, conforme descrito no exemplo 1, com a excepção de terem sido preparados ésteres butílicos, para uma melhor quantificação de C 2:0, em vez dos ésteres metílicos, utilizando para tal um modo operatório perfeitamente descrito na literatura.

Os valores agrupados no quadro 2 subsequente baseiam-se no peso dos ácidos gordos.

QUADRO 2

Ácido gordo	Lecitina modificada
C 2:0	3,5
C 4:0	0,3
C 14:0	1,9
C 16:0	24,5
C 18:0	5,4
C 18:1	11,3
C 18:2	45,5
C 18:3	7,7

Exemplo 3

Efectuou-se a preparação de temperos para saladas contendo 30% de óleo de soja, 60% de água, 10% de vinagre, 0,3% de goma de xantano e 1% de lecitina modificada em conformidade com o processo indicado no exemplo 1. Para efeitos de comparação efectuou-se a preparação dos mesmos temperos para saladas com a lecitina vulgar (comparação 3) ou com uma mistura de lecitina vulgar:triglicéridos de cadeia média, numa proporção respectivamente igual a 2:1 (comparação 4).

Testou-se a sua estabilidade térmica no que diz respeito aos parâmetros de homogeneidade e viscosidade, conforme adiante se descreve.

Manteve-se a incubar durante 2 horas uma quantidade de 20 mL do respectivo tempero para saladas, à temperatura de 80°C (temperatura obtida em banho-maria). Após a incubação, a amostra que continha a lecitina vulgar apresentava-se não homogénea, sendo visível uma certa estratificação, ao passo que a amostra que continha a lecitina modificada era homogénea, sem nenhuma estratificação.

Detectou-se a viscosidade por meio de um ensaio com colher (escorrimento de uma amostra a partir de uma colher) e com um reómetro (velocidade de corte relativamente à tensão de corte). Os dois resultados evidenciaram uma forte viscosidade das amostras que continham a lecitina modificada: a uma velocidade de corte de 240/segundo, a tensão de corte era igual a 160 para a amostra que continha a lecitina vulgar e era igual a 185 para a amostra que continha a lecitina modificada. Antes do choque térmico as duas amostras tinham um valor de 185.

f L A

Os triglicéridos de cadeia média não tiveram nenhuma influência sobre nenhum destes factores. As amostras que continham a lecitina modificada em conformidade com a presente invenção revelaram ser mais termostáveis do que as amostras que continham a lecitina vulgar (comparação 3) e as amostras que continham a mistura de lecitina vulgar e de triglicéridos de cadeia média. Após centrifugação observou-se na parte superior uma quantidade de óleo nitidamente inferior, tendo sido recolhida uma quantidade de 0,25 g de óleo para uma lecitina vulgar com (comparação 4) ou sem (comparação 3) triglicéridos de cadeia média que havia sido acrescentada, comparativamente com uma quantidade de 0,18 g com a lecitina modificada em conformidade com a presente invenção. Também foi detectada, no caso da última amostra, uma redução nítida de sabores desagradáveis.

Exemplo 4

Testou-se o efeito estabilizador da lecitina modificada em conformidade com a presente invenção sobre as proteínas da gema do ovo. Submeteu-se a uma choque térmico (c.t.) 10 mL de gema de ovo homogeneizada e diluída 5 a 10 vez, colocada num frasco que por sua vez foi colocado durante 30 segundos em banho-maria a 80°C.

Mediu-se o diâmetro das partículas (D(v, 0,9) em micrómetros) antes e depois do choque térmico. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 3 seguinte.

QUADRO 3

D	Nº Lec.	0,5% de Lec.	0,5% de Lec. modificada	1% de Lec.	1% de Lec. modificada	2% de Lec.	2% de Lec. modificada
Antes do c.t.	28	18	11	9	4	4	6
Depois do c.t.	75	60	41	55	17	15	13

É possível concluir que as amostras que continham a lecitina modificada em conformidade com a presente invenção eram mais estáveis. Em geral, é possível afirmar que se pode obter o mesmo efeito esta-

bilizador da lecitina com metade da quantidade de lecitina modificada em conformidade com a presente invenção.

Exemplo 5

Produziu-se uma maionese completa constituída por 50 g de gema de ovo, 3 g de sal, 5 g de mostarda, 200 g de óleo vegetal, 3 g de vinagre, 5 g de sumo de limão e 6 mL de água, sem lecitina ou com adição de diferentes quantidades de lecitina vulgar ou modificada. Introduziu-se 100 g de cada maionese em recipientes que foram fechados hermeticamente e que ficaram depois a incubar durante dois períodos de 30 minutos a 100°C. A seguir decantou-se totalmente e mediu-se o óleo da parte superior. Os resultados obtidos estão agrupados no quadro 4 seguinte.

QUADRO 4

Amostra	Quantidade de óleo na parte superior após o tratamento térmico (g)
Nenhuma quantidade de lecitina acrescentada	13,2
Adição de 1% de lecitina vulgar	6
Adição de 1,5% de lecitina vulgar	5
Adição de 1% de lecitina modificada em conformidade com o Exemplo 1	3,5
Adição de 2% de lecitina modificada em conformidade com o Exemplo 1	1,1
Adição de 1% de lecitina modificada em conformidade com o Exemplo 2	1
Adição de 2% de lecitina modificada em conformidade com o Exemplo 2	0,5
Adição de 1% de lisolectina	2,2
Adição de 2% de lisolectina (Emulfluid (TM), Lukas Meyer)	1

Verificou-se novamente que uma quantidade igual ou inferior a cerca de metade da lecitina modificada em conformidade com a presente invenção tinha o mesmo efeito estabilizador que uma quantidade comparável de lecitina vulgar e tinha mesmo um melhor efeito estabilizador do que uma lisolecitina de tipo comercial.

Exemplo 6

Dissolveu-se em hexano lecitina vulgar ou modificada (tal como no exemplo 2) e depois pulverizou-se sobre leite em pó, enquanto se ia efectuando a mistura. A seguir evaporou-se o hexano sob agitação.

Para a medição da humectabilidade verteu-se à colher 5 g de leite em pó sobre 100 mL de água à temperatura ambiente e mediu-se o tempo total de imersão do leite em pó sob a superfície. Os tempos obtidos indicam que a lecitina vulgar melhora consideravelmente a humectabilidade do leite em pó, mas também se comprovou que a lecitina modificada em conformidade com o exemplo 2 apresenta um comportamento ainda melhor.

No quadro 5 subsequente estão agrupados os resultados respeitantes aos tempos de submersão.

QUADRO 5

Amostra	Tempo de submersão (s)
Leite em pó puro	>120
Leite em pó + 0,5% de lecitina	21
Leite em pó + 0,5% de lecitina modificada	9
Leite em pó + 1% de lecitina	15
Leite em pó + 1% de lecitina modificada	7

Exemplo 7

De uma forma análoga à descrita no Exemplo 6 testou-se uma preparação de cacau instantâneo contendo sacarose, cacau em pó, aroma de cacau e 1% de lecitina. Foram preparadas duas amostras

f l a

contendo 1% de lecitina vulgar ou de lecitina modificada com a triacetina (tal como no exemplo 2).

As amostras foram submetidas a uma operação de aglomeração ao vapor de água e transformadas numa preparação de cacau de tipo comercial. Para a avaliação da humectabilidade verteu-se 21 g da preparação de cacau sobre 250 mL de leite à temperatura ambiente e mediu-se o tempo de submersão da totalidade da substância. Manteve-se as amostras sob observação durante vários dias. No quadro 6 subsequente estão indicados os resultados obtidos

QUADRO 6

Tempo de submersão em segundos (dias)	Lecitina vulgar	Lecitina modificada
0	15	11
3	35	17
5	32	13
7	35	10
10	40	15
21	35	12
28	37	16
35	42	19
42	39	17

Exemplo 8

Misturou-se manteiga clarificada 'ODELL'S (TM)', com um teor em humidade não superior a 0,1%, com lecitina segundo uma proporção igual a 2:1 e acrescentou-se as lipases e as fosfolipases immobilizadas, tal como descrito nos exemplos precedentes. As condições de reacção foram também idênticas às anteriormente descritas. A lecitina modificada obtida tinha a composição em ácidos gordos indicada no quadro 7 seguinte.

QUADRO 7

Ácido gordo	Lecitina modificada
C 4:0	1,2
C 6:0	0,8
C 8:0	1,5
C 10:0	1,4
C 12:0	3
C 14:0	11,9
C 16:0	20,9
C 18:0	22,4
C 18:1	17,9
C 18:2	15,3
C 18:3	3

Lisboa, 13 de Dezembro de 2000
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

H - A

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de permuta de grupos acilo num fosfolípido por troca enzimática com um triacil-glicerol, caracterizado pelo facto de a reacção se efectuar na ausência de solvente com um sistema enzimático constituído por uma mistura de uma lipase imobilizada e de uma fosfolipase imobilizada e pelo facto de o triacil-glicerol conter grupos acilo saturados de cadeia curta em C₂ a C₄ e/ou de cadeia média em C₆ a C₁₂.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de o triacil-glicerol ser a triacetina, o óleo de manteiga ou um triglicérido em C₆ a C₁₂.
3. Processo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo facto de o triacil-glicerol ser a triacetina e o fosfolípido ser separável da triacetina que não tenha reagido, designadamente por decantação.
4. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto de a reacção ter lugar em presença de uma lecitina desumidificada.

Lisboa, 13 de Dezembro de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

H - A +