



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

(11) PI 0509684-7 B1

(22) Data do Depósito: 07/04/2005

(45) Data de Concessão: 30/05/2017



(54) Título: PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE PRODUTOS DE LECITINA HIDROLISADOS

(51) Int.Cl.: C12P 7/64; C12P 9/00

(30) Prioridade Unionista: 09/04/2004 US 10/822,222

(73) Titular(es): CARGILL, INC.

(72) Inventor(es): MARC HEIRMAN; MICHAEL SCHNEIDER; JOHN VAN DER SYPE; FALK BRÜSE;
HEIDI SCHMITT

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE PRODUTOS DE LECITINA HIDROLISADOS
Campo da Invenção

A invenção refere-se a processos para hidrólise enzimática de misturas fosfolipídio-triglicerídio, tal como
5 as lecitinas, derivadas de produtos naturais, e em particular à produção de produtos de lecitina hidrolisada, e aos produtos de lecitina hidrolisada obtidos através de tais processos.

Referências

10 D.Adlercreutz et al., Synthesis of phosphatidylcholine with different fatty acid in sn-1 position by lipase-catalyzes sterification and transesterification reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 403-411 (2002).

A. Bastida et al., A single step purification,
15 immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering* 58(5): 486-493 (1998).

V.M. Balcao et al., Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*
20 18:391-416 (1995).

Editora G.F. Bickerstaff, *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana, Totawa, NJ, 1997.

U.T. Bornscheuer et al., Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in*
25 *Biotechnology* 20(10):433-437 (2002).

O.Chmiel et al., Process for the interesterification of phospholipids. Patente number U.S. 5.989.599 (1999).

W.Cho et al., Efficient immobilization of phospholipase A2. *Methods in Molecular Biology* 109:303-307
30 (1999).

R.Fernandez-Lafuente et al., Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of Lipids* 93(1-2):185-97 (June, 1998).

M.J. Haas et al., The hydrolysis of
5 phosphatidylcholine by an immobilized lipase: optimization of hydrolysis in organic solvents. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 70(2):111-17 (1993).

M.Haas et al., Enzymic phosphatidylcholine in organic solvents: an examination of selected commercially available
10 lipases. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 71(5):483-90 (1994).

M.J.Haas et al., The enzymic hydrolysis of triglyceride-phospholipid mixtures in an organic solvent. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 72(5):519-25
15 (1995).

F.Hara et al., Comparative study of commercially available lipases in hydrolysis reaction of phosphatidylcholine. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74(9):1129-1132 (1997).

20 F.D.Gunstone, Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79:1535-1549 (1999).

A.E.Ivanov et al., Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis. *Journal of*
25 *Molecular Catalysis B: Enzymatic* 3:303-309 (1997).

B.Jirjis et al., Method for removing phospholipids from vegetable oil miscella, method for conditioning a polymeric microfiltration membrane, and membrane. U.S Patente number 6.207.209 (2001).

B.Jirjis et al., Method and apparatus for processing vegetable oil miscella, method for conditioning a polymeric microfiltration membrane, membrane, and lecithin product. U.S. Patente number 6.833.149 (2004).

- 5 S.T.Kang et al., Characteristics of immobilized lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil of high concentration in reverse phase system. *Biotechnology and Bioengineering* 33(11):1469-76 (1989).

F.X.Malcata et al., Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzymes and Microbial Technology* 14(6):426-46 (June, 1992).

F.X.Malcata et al., Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils - a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67(12):890-910 (1990).

- 15 Editora K.Mosbach, *Methods in Enzymology*, Volume 137: Immobilized Enzymes and Cells. Academic Press, San Diego, CA, 1988.

A.Mustranta et al., Comparison of lipases and phospholipases in the hydrolysis of phospholipids. *Process Biochemistry* 30(5):393-401 (1995).

I.C.Omar et al., Hydrolysis of triglycerides by immobilized thermostable lipase from *Humicola lanuginosa*. *Agricultural and Biological Chemistry* 52(1):99-105 (1988).

M.V.Ramachandra et al., Hydrolysis of oils by using immobilized lipase enzyme: A review. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 7(2):57-66 (2002).

B.Sas et al., Improved method for the conversion of lecithin into lysolecithin. Número de publicação no PCT WO 00/52190 (2000).

J.F.Shaw et al., Lipolytic activities of a lipase immobilizes on six selected supporting materials. *Biotechnology and Bioengineering* 35(2):132-7 (1990).

D.K.Shen et al., Characterization and expression of
5 phospholipases B from the opportunistic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* 239(1):87-93 (2004).

Antecedentes da Invenção

As lecitinas e lecitinas modificadas são amplamente utilizadas na indústria, inclusive nas indústrias
10 alimentícias e farmacêuticas, como solubilizantes, emulsificantes, e outros tipos de aditivos. Obtêm-se as lecitinas a partir de várias fontes animais ou vegetais, tais como fava de soja ou gema de ovo, e compreende uma mistura de fosfolipídios e triglicerídios, assim como
15 quantidades de compostos menores, tais como glicolipídios, carboidratos, ácidos graxos, e/ou esteróis.

A hidrólise parcial dos fosfolipídios na lecitina foi encontrada para melhorar as propriedades de emulsificação. Essa modificação é, comumente, mais eficaz no tratamento da
20 lecitina com fosfolipase A1 e/ou A2, que hidrolisa de maneira seletiva o primeiro ou o segundo ácido graxo glicerila, respectivamente, de fosfolipídios, que produz lisofosfolipídios.

A adição de mono e diglicerídios para as lecitinas ou as
25 lecitinas parcialmente hidrolisadas também foi descoberta a fim de melhorar as propriedades nos produtos finais, tais como as características de cozedura da farinha ou propriedades de anti-respingo da margarina, especialmente aquelas que possuem um conteúdo com pouca gordura, por exemplo, 60% em peso de gordura
30 ou menos (vide, por exemplo, a Patente número EP 253429; Patente

número U.S.3.505.074; PCT número de publicação WO 02/49444). Demais exemplos de produtos alimentícios e para alimentação nos quais tais composições são úteis, inclusive massa congelada, produtos de panificação, para melhorar as propriedades de anti-
5 sustentação, produtos de carne emulsificada, sorvete, coberturas, e outros sistemas de emulsão.

Atualmente, produtos de lecitina que contêm grandes quantidades de mono e diglicerídios são preparados ao adicionar esses componentes às lecitinas. Seria útil
10 preparar tais produtos diretamente, numa maneira controlada, através de hidrólise enzimática da lecitina e composições relacionadas.

Descrição Detalhada Da Invenção

I. Visão Geral

15 Sob um aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um produto hidrolisado que compreende fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios, e diglicerídios, o método compreende:

- (a) entrar em contato com um material de partida derivado
20 a partir de um óleo vegetal, que compreende um componente fosfolipídio e um componente triglicerídio, em um meio solvente aquoso ou orgânico, com uma primeira enzima; e
- (b) subseqüentemente, entrar em contato com o produto da etapa (a) com uma segunda enzima, diferente da primeira
25 enzima;

onde uma das enzimas é uma fosfolipase ou lipase eficaz para hidrolisar o fosfolipídio, e a outra das enzimas é uma fosfolipase ou lipase eficaz para hidrolisar o triglicerídio.

Em modalidades selecionadas, a segunda enzima é uma lipase, e a primeira enzima é uma fosfolipase, por exemplo, fosfolipase A1 e/ou A2. Em uma tal modalidade, a primeira enzima é uma fosfolipase A2.

5 Em outra modalidade, a primeira enzima é fosfolipase D. Essa modalidade pode compreender adicionalmente, anterior à dita etapa de conexão (b), a reação do produto da etapa (a) com fosfolipase A1 e/ou A2. Ainda em outra modalidade, a primeira enzima é a fosfolipase C.

10 Nesse processo, e todos os processos de hidrólise proporcionados no presente, o material de partida é preferencialmente derivado a partir de uma fonte que ocorre naturalmente, tais como gema de ovo ou um óleo vegetal. De preferência, o material de partida é derivado diretamente
15 de uma fonte que ocorre naturalmente, isto é, sem adição de fosfolípido externo, triglicerídio, mono/diglicerídio, ou componentes de ácido graxo.

O material de partida pode ser um material de lecitina, por exemplo, dotado de um conteúdo insolúvel de
20 acetona (A.I.) contendo pelo menos 50%, de preferência 60%, por peso. (As proporções descritas no presente são percentuais de peso, salvo indicações contrárias). Alternativamente, pode-se usar os materiais de partida dotados de valores de A.I. menores, por exemplo, 10%-50%
25 por peso.

O produto hidrolisado é, preferivelmente, um produto de lecitina hidrolisada, isto é, dotado de pelo menos 50%, e mais preferivelmente pelo menos 56%, de materiais insolúveis de acetona. O produto hidrolisado tem, de
30 preferência, um valor ácido menor que 45 mg de KOH/grama.

Em outras modalidades, o produto hidrolisado compreende pelo menos 60% dos materiais insolúveis de acetona.

As etapas (a) e (b) do processo acima pode ser realizado em um meio aquoso ou, alternativamente, em um solvente orgânico, tal como um solvente hidrocarboneto. No último caso, o material de partida pode ser um retentado de um processo de degomagem membranar de óleo vegetal. Em uma modalidade desse aspecto, as etapas (a) e (b) são realizadas na presença da membrana eficaz para separar os fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios, e diglicerídios a partir de ácidos graxos liberados.

Em um aspecto relacionado, a invenção proporciona um método adicional para produzir um produto hidrolisado que compreendem fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios, e diglicerídios, o método compreende: entrar em contato com um material de partida que compreende um componente fosfolipídio e um componente triglicerídio, em um solvente orgânico aprótico, com primeira e segunda enzimas, onde a primeira enzima é uma fosfolipase ou lipase eficaz para hidrolisar o fosfolipídio, e a segunda enzima, diferente da primeira enzima, é uma lipase ou fosfolipase, de preferência uma lipase, eficaz para hidrolisar o triglicerídio.

Em uma modalidade, o material de partida é colocado em contato com a primeira e segunda enzimas, de maneira simultânea; em outra modalidade, as enzimas são empregadas em seqüência, em ambas as ordens. Isto é, a "primeira" enzima pode ser empregada antes, depois, ou concorrentemente com a "segunda" enzima.

De preferência, a primeira enzima (isto é, a enzima eficaz para hidrolisar o fosfolipídio) é a fosfolipase A1

e/ou A2. Em uma modalidade, a primeira enzima é a fosfolipase A2.

O solvente orgânico aprótico pode ser um solvente hidrocarboneto, tal como hexano. Em uma modalidade, o
5 material de partida de lecitina é um retentado de um processo de degomagem membranar de óleo vegetal.

Em um aspecto adicional, a invenção proporciona um método de produção de produto hidrolisado que compreende pelo menos dois componentes selecionados a partir de
10 fosfolipídios, fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios, diglicerídios, e triglicerídios, o método compreende: entrar em contato com um material de partida que compreende um componente fosfolipídio e um componente triglicerídio, num meio solvente orgânico, com uma lipase ou uma
15 fosfolipase C, onde o material de partida é um retentado a partir de um processo de degomagem membranar de óleo vegetal.

Em uma modalidade, a enzima é uma lipase, e o produto hidrolisado compreende fosfolipídios e diglicerídios e, em
20 alguns casos, monoglicerídios. Em outra modalidade, a enzima é fosfolipase C, e o produto hidrolisado compreende fosfolipídios, triglicerídios e diglicerídios. Nesse caso, o método pode compreender adicionalmente a reação do produto hidrolisado com a fosfolipase A1 e/ou A2.

25 Ainda em outro aspecto, a invenção proporciona um método de produção de um produto hidrolisado que compreende fosfolipídios, monoglicerídios, e diglicerídios, o método compreende: entrar em contato com um material de partida derivado a partir de um óleo vegetal, que compreende um
30 componente fosfolipídio e um componente triglicerídio, num

solvente aquoso, com uma lipase, na ausência de uma fosfolipase. De preferência, a lipase é eficaz para hidrolisar de forma seletiva os triglicerídios sob as condições de contato.

5 Cada um dos processos descritos no presente documento, compreendem, preferivelmente, as etapas adicionais de remoção ou desativação da(s) enzima(s), e remoção do meio solvente. Essas etapas podem ser seguidas, mais adiante, da formulação do produto hidrolisado dentro de um produto
10 alimentício.

Em um aspecto relacionado, a invenção proporciona um produto de lecitina hidrolisada, onde o produto contém fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios, e diglicerídios, e é produzido por qualquer dos processos supra mencionados, onde o
15 material de partida é derivado diretamente de um óleo vegetal, e o processo inclui as etapas de remoção ou desativação de enzima(s) e remoção do meio solvente. O produto de lecitina hidrolisada consiste, essencialmente, de componentes do material de partida e substâncias hidrolisadas, as quais
20 são obtidas a partir do material de partida através da reação de enzima(s). De preferência, o produto de lecitina hidrolisada contém pelo menos 50%, e mais preferivelmente pelo menos 56%, de materiais insolúveis de acetona e tem um valor ácido menor que 45 mg de KOH/grama. Em modalidades
25 selecionadas, o produto contém pelo menos 60% de materiais insolúveis de acetona.

Em demais aspectos relacionados, a invenção proporciona um produto alimentício que compreende o produto de lecitina hidrolisada da invenção. E um método de
30 formulação de um produto alimentício, ao combinar um

produto de lecitina hidrolisada da invenção com ingredientes consumíveis adicionais.

Esses e outros objetos e características da invenção são melhor descritos na descrição detalhada da invenção a
5 seguir.

II. Processos para Modificação Enzimática de Lecitina ou Composições Relacionadas

A invenção proporciona métodos para produção de produto hidrolisado, que compreende fosfolipídios e/ou fosfolipídios
10 hidrolisados, monoglicerídios, e diglicerídios (os dois últimos componentes referidos, em conjunto, como mono/diglicerídios). Tipicamente, o produto inclui ainda fosfolipídios não-hidrolisados e triglicerídios. Os fosfolipídios hidrolisados são, tipicamente, lisofosfolipídios, e pode ainda incluir ácido
15 fosfolipídio e/ou ácido lisofosfatídeo.

De acordo com a invenção, o produto hidrolisado é produzido diretamente através de tratamento enzimático de um material de partida, conforme descrito abaixo, sem
adição separada de qualquer dos componentes supra
20 denominados. O material de partida é, de preferência, derivado a partir, diretamente, de um óleo vegetal, por exemplo, um material obtido a partir de um processamento convencional de um óleo vegetal.

Em modalidades preferidas, o processo produz um
25 produto de lecitina hidrolisada, que compreende 50%, de preferência 56%, e mais preferivelmente pelo menos 60%, dos materiais insolúveis de acetona (os quais consistem, primariamente, de fosfolipídios e/ou fosfolipídios hidrolisados) e que possuem um valor ácido menor que 45 mg de KOH/grama.

A. Materiais de Partida

O processo descrito no presente emprega um material de partida dotado de um componente fosfolipídio (de preferência pelo menos 10%, e mais preferivelmente pelo menos 25%, e mais preferivelmente pelo menos 40% por peso) e um componente triglicerídio. Quando o material de partida compreende um nível de materiais insolúveis de acetona (os quais consistem, primariamente, de fosfolipídios) que comporta com padrões legislativos para "lecitina", pode-se referir o material de partida como um material de partida de lecitina. Esse nível de insolúveis de acetona é, no geral, pelo menos 50% por peso, por exemplo, 56% ou mais por peso, ou 60% ou mais por peso.

O material de partida é, de preferência, derivado a partir de fontes que ocorrem naturalmente, tais como gema de ovo ou um óleo vegetal, onde um "óleo vegetal" inclui qualquer óleo extraído das sementes, frutas ou noz de uma planta. Exemplos comuns incluem girassol, semente de colza, canola, semente de algodão, e, em particular, óleo de soja. De preferência, o material de partida é diretamente derivado a partir de uma fonte que ocorre de forma natural, isto é, sem adição de fosfolipídio, triglicerídio, mono/diglicerídio, ou componentes de ácido graxo externos.

De maneira conveniente, o material de partida pode ser produzido via um processamento convencional de materiais que ocorrem de forma natural, tipicamente um óleo vegetal, tais como óleo de soja. Em modalidades preferidas, o material de partida é um material obtido através de água ou degomagem membranar de um óleo vegetal.

Por exemplo, em um procedimento típico para o processamento de óleo de soja cru, as sojas são descascadas e extraídas com hexano a fim de produzir um extratante (miscela) que inclui hexano e óleo de soja cru. O óleo de soja cru, contém como componente em maior quantidade, óleo glicérico, em adição aos fosfolipídios, açúcares, esteróis, glucosídios esteróis, ácidos graxos, e outros componentes em quantidades menores.

Separam-se os fosfolipídios da maioria do óleo glicérico na miscela, em um processo conhecido como "degomagem". Na degomagem por água convencional, isso é feito, no geral, através da remoção do solvente hexano, hidratando os fosfolipídios com água quente ou vapor, e centrifugação. A remoção de uma certa quantidade ou da quantidade total da água dada ao material de lecitina crua, contém, tipicamente, cerca de 60-65% de insolúveis de acetona, com os triglicerídios primariamente remanescentes, e quantidades menores de outros componentes, tais como açúcares, esterol, glucosídios, e/ou ácidos graxos. Pode-se usar tais materiais como um material de partida nos processos descritos no presente documento.

Mais recentemente, desenvolveu-se métodos para a degomagem membrana de óleo de soja, o qual, no geral, produz um produto mais puro que a degomagem por água. Vide, por exemplo, Jirjis et al., nas Patentes números U.S. 6.207.209 e 6.833.149. Em uma modalidade preferida da presente invenção, o material de partida é proporcionado através de um tal processo. Na degomagem membrana, um miscela de óleo vegetal em um solvente de hidrocarboneto, tipicamente hexano, é admitido por uma membrana, que produz

uma corrente permeável a qual é exaurida em fosfolipídios e uma corrente de retentado que é enriquecida em fosfolipídios, em relação ao conteúdo de fosfolipídio da miscela.

O retentado, com ou sem o solvente hexano, pode ser
5 usado como um material de partida nos processos presentes. O conteúdo de fosfolipídio de tal retentado pode ser variado ao variar as condições de separação, por exemplo, a razão de permeabilidade do retentado, tempo de separação, e/ou número de estágios de separação. (Vide, por exemplo,
10 Jirjis et al., supra citado.) O conteúdo de fosfolipídio do retentado (exclusivo do solvente) pode ser, por exemplo, entre cerca de 10% e cerca de 85%, e é tipicamente entre cerca de 50%-85%.

B. Condições de Reação: Geral

15 A reação pode ser realizada em um meio aquoso, onde os substratos lipídeos são, no geral, presentes na forma de agregados, tais como micela ou vesícula. A expressão "meio aquoso", conforme usada no presente documento, refere-se à água, ou a um meio solvente que contém água e em uma
20 quantidade inferior de um segundo solvente miscível em água. De preferência, o meio aquoso contém no máximo 10%, mais preferivelmente no máximo 5%, de um segundo solvente miscível em água. Mais preferivelmente, o meio aquoso contém menos que 1% ou não contém um segundo solvente.

25 A reação pode ser realizada um meio solvente orgânico. Conforme usado no presente, o termo "meio solvente orgânico" refere-se a um solvente orgânico, de preferência um solvente aprótico (isto é, não um álcool ou amina), e mais preferivelmente um solvente não-polar, porém, entende-se
30 se que um meio de reação inclui um conteúdo de água

suficiente para ocorrer a hidrólise. De preferência, o conteúdo de água é em um nível eficaz para promover a hidrólise e minimizar a transesterificação. Pode-se adicionar a água à um meio de reação, por exemplo, ao usar
5 um solvente saturado de água, ou pode ser proporcionado por indução ou água residual no material de partida.

Nas modalidades selecionadas, os processos de hidrólise, conforme descrito no presente, são realizados sob condições eficazes para inibir a transesterificação dos
10 fosfolipídios hidrolisados com ácidos graxos liberados. Tais condições podem incluir a presença de água suficiente para impedir a esterificação, ou a presença de sais para isolar os ácidos graxos liberados. Por exemplo, um sal ou uma base fraca pode ser adicionado a mistura de reação para
15 isolar os ácidos graxos liberados. O tal sal pode, por exemplo, ser um cloreto de cálcio em excesso. O cloreto de cálcio é incluído, rotineiramente, como um ativador iônico em reações que empregam fosfolipase.

De maneira alternativa ou em adição, a reação pode ser
20 realizada na presença de uma membrana dotada de uma composição e tamanho de poro eficaz para remover ácidos graxos a partir da mistura de reação. Essa característica ainda serve para aumentar o conteúdo de insolúveis de acetona (A.I) do produto hidrolisado.

25 Outras condições de reação que podem ser variadas nos processos descritos no presente documento incluem, por exemplo, o estado da enzima (por exemplo, se estiver imobilizada ou não), temperatura, pH, presença e concentração de outras atividades, e concentração de
30 substrato. Condições exemplificativas são descritas abaixo.

C. Processos de Hidrólise de Duas Enzima

Em uma modalidade da invenção, o material de partida é um hidrolisado em um processo de duas enzimas, que usa duas enzimas diferentes. De maneira específica, uma primeira
5 enzima, tipicamente, uma fosfolipase (ou uma lipase reativa a fosfolipídio, conforme discutido abaixo) é usada para hidrolisar fosfolipídios no material de partida em lisofosfolipídios e/ou ácidos fosfatídicos, e uma segunda enzima, tipicamente uma lipase (ou, em alguns casos, uma
10 fosfolipase dotada de atividade de lipase) é usada para hidrolisar triglicerídios em mono/diglicerídios. De preferência, a primeira enzima é uma fosfolipase, tal como a fosfolipase A2, para a hidrólise de fosfolipídios, e a segunda enzima é uma lipase, para a hidrólise de
15 triglicerídios (Note que o uso de "primeira" e "segunda", nesse caso, não indica, necessariamente, ordem cronológica de reação).

O uso de duas enzimas diferentes pode proporcionar uma flexibilidade maior, nas extensões de componentes de
20 produtos obtidos, com relação às quantidades relativas de componentes hidrolisados diferentes presentes, que um único processo enzimático. As duas enzimas podem ser usadas simultânea ou sequencialmente, em ambas as ordens, conforme descrito adiante abaixo.

25 De modo mais genérico, cada uma das duas enzimas diferentes, é uma fosfolipase ou uma lipase, onde uma enzima é proporcionada para hidrolisar fosfolipídios no material de partida, por exemplo, em lisofosfolipídios, e a outra é proporcionada para hidrolisar triglicerídios no
30 material de partida em mono/diglicerídios. Tipicamente, uma

enzima é uma fosfolipase que hidrolisa, de forma seletiva, fosfolipídios, e a outra é uma lipase que hidrolisa, de maneira seletiva, triglicerídios. (O termo "seletivo" conforme usado aqui, indica que a enzima hidrolisa um substrato particular, tal como um fosfolipídio, em um grau maior que o mesmo hidrolisa um substrato diferente, tal como um triglicerídio, sob condições equivalentes. O termo "grau" de hidrólise refere-se à porcentagem de mol de hidrolisado de substrato. O grau de hidrólise de um substrato relativo a outro através de uma enzima seletiva pode diferir por um fator de duas ou mais, por um fator de cerca de 5 ou mais, ou por um fator de cerca de 25 ou cerca de 50 ou mais.)

Conforme discutido abaixo, algumas lipases são conhecidas para hidrolisar fosfolipídios, em alguns casos, em um grau maior que estas hidrolisam triglicerídios. Inversamente, muito embora seja menos comum, algumas fosfolipase são conhecidas para hidrolisar triglicerídios, em alguns casos, para um grau maior que estas hidrolisam fosfolipídios. Em geral, a atividade e seleção de tais enzimas é dependente das condições de reação.

Dessa maneira, a seleção de duas enzimas pode incluir combinações diferentes de lipase(s) e fosfolipase(s), fornecidas para que uma tenha atividade de lipase significativa e/ou seletiva e a outra tenha atividade de fosfolipase significativa e/ou seletiva, sob as condições da reação. (O termo atividade "significante" conforme usado aqui indica que uma enzima hidrolisa pelo menos 1 mol %, preferivelmente pelo menos 5%, e mais preferivelmente pelo

menos 10% ou pelo menos 25 mol % de um substrato particular, sob determinadas condições de reação.)

Conforme descrito mais adiante abaixo, a reação de duas enzimas, quando realizada em solvente aquoso, vantajosamente emprega uma enzima fosfolipase (ou seletivo fosfolipídio) em um primeiro estágio, e uma enzima lipase (ou seletivo triglicerídio) em um estágio posterior. A reação em solvente orgânico pode empregar as duas enzimas de forma seqüencial, em ambas as ordens, ou simultaneamente. A última reação é, de preferência, realizada em um retentado a partir de um processo de degomagem membranar.

C1. Reação de Duas Enzimas em Meio Aquoso

Em uma modalidade, o processo de duas enzimas é realizado em um meio aquoso, conforme definido acima. O material de partida para tal reação contém, conforme descrito acima, um componente fosfolipídio e um componente triglicerídio, de preferência derivado, diretamente, a partir de um óleo vegetal. Tal material de partida pode ser, por exemplo, um material cru obtido a partir de degomagem por água de óleo de soja, conforme supra descrito. No entanto, um material de partida obtido a partir de um processo de degomagem membranar pode ainda ser hidrolisado em um meio aquoso.

Quando se realiza a hidrólise em um meio aquoso, descobriu-se que a hidrólise inicial de triglicerídios pode ser guiada para um grande aumento na viscosidade do meio. Dessa maneira, quando se realiza o processo de duas enzimas em um meio aquoso, prefere-se que o material de partida seja conectado primeiro com uma enzima eficaz para

hidrolisar, seletivamente, fosfolipídios, por exemplo, uma fosfolipase ou lipase seletiva de fosfolipídio. Após tempo suficiente para a reação, opcionalmente, a recuperação de um produto intermediário, o material entra em contato, de
5 forma subsequente, com uma enzima eficaz para hidrolisar de forma seletiva, triglicerídios, por exemplo, uma lipase ou uma fosfolipase dotada de atividade de lipase.

Tipicamente, a primeira enzima em um tal processo é uma fosfolipase, tal como uma fosfolipase A2, e a segunda é
10 uma lipase, de preferência, uma lipase seletiva de triglicerídio. Exemplos de tais processos são proporcionados abaixo nas Seções V e VI.

Conforme discutido a seguir abaixo, as enzimas podem ser imobilizadas, o que facilita a remoção das mesmas da
15 mistura de reação. De maneira alternativa, as enzimas que não são imobilizadas são desativadas ao completar a reação, por exemplo, por termo-tratamento.

C2. Reação de Duas Enzimas em Solvente Orgânico

O processo de duas enzimas pode ainda ser realizado em
20 um meio solvente orgânico, de preferência um solvente aprótico, que contém água suficiente para que ocorra a hidrólise, e preferivelmente, água suficiente para promover a hidrólise e inibir a transesterificação. O material de partida é preferivelmente proporcionado no solvente
25 orgânico. Em uma modalidade, o processo é realizado em um retentado obtido na degomagem membranar de óleo vegetal, tipicamente óleo de soja. Um retentado típico, conforme descrito, por exemplo, nas Patentes números U.S.6.207.209 e 6.833.149, contém a maioria dos fosfolipídios presentes no
30 óleo pré-processado, desde que esses compostos formem

grandes agregados no solvente de hidrocarboneto, que não penetram nos poros da membrana. No entanto, conforme notado acima, os retentados que possuem níveis variados de fosfolipídios podem ser obtidos, ao varias as condições
5 usadas durante a separação da membrana, por exemplo, ao variar a razão de permeabilidade do retentado. O retentado, em geral, contém também uma fração significativa de triglicerídios.

O solvente orgânico pode ser qualquer solvente que
10 seja inerte às condições de reação, inclusive, por exemplo, ésteres de peso molecular baixo ou cetona, hidrocarbonetos halogenados, ou preferivelmente, hidrocarbonetos. Os solventes de hidrocarbonetos preferidos incluem alcanos, cicloalcanos, e hidrocarbonetos aromáticos simples, por
15 exemplo, benzeno e seus homólogos que contenham substituintes de alquila dotados de acima de quatro átomos de carbono. Hidrocarbonetos exemplificativos incluem benzeno, tolueno, xileno, C₃-C₆ cicloalcanos, C₅-C₈ alcanos, misturas dos mesmos, por exemplo, éter de petróleo, e C₅-C₈
20 alcanos.

Quando o processo de duas enzimas é realizado em um solvente orgânico, as duas enzimas podem ser adicionadas seqüencialmente, conforme descrito acima, com isolamento opcional de um produto intermediário. Alternativamente,
25 quando um meio solvente orgânico é usado, as duas enzimas podem ser usadas de forma simultânea. Exemplos de ambos os tipos de reações são fornecidas abaixo nas Seções V e VI.

Pode-se realizar o processo, particularmente quando feitos em um solvente orgânico, na presença de uma membrana
30 eficaz para separar os componentes do produto hidrolisado,

por exemplo, fosfolipídios, fosfolipídios hidrolisados, triglicerídios, monoglicerídios, e/ou diglicerídios, a partir de ácidos graxos liberados. Uma composição membranar adequada, tamanho de poro, e pressão de operação podem ser
5 selecionados, de acordo com métodos conhecidos na técnica, a fim de permitir que os ácidos graxos livres passem, de forma seletiva, através da membrana. Essa característica pode ser eficaz para aumentar o conteúdo de insolúvel de acetona (A.I) do produto hidrolisado.

10 Conforme discutido adiante abaixo, as enzimas podem ser imobilizadas, o que facilita a remoção das mesmas a partir da mistura de reação. As enzimas não-imobilizadas são desativadas seguindo a finalização da reação, tipicamente por aquecimento.

15 **D. Processo de Enzima Única**

Em outra modalidade da invenção, um retentado do processo de degomagem membranar de óleo vegetal, conforme descrito acima, é usado como o material de partida em um processo de hidrólise de enzima única, onde a enzima é uma
20 fosfolipase ou, de preferência, uma lipase. Conforme supra descrito, e a seguir na Seção III abaixo, algumas lipases têm atividade de fosfolipase significantes e são eficazes para hidrolisar tanto triglicerídios (em mono/diglicerídios) quanto fosfolipídios (em lisofosfolipídios). A razão dessas
25 atividades em uma preparação de enzima muitas vezes varia com as condições de reação, particularmente solvente e pH. De preferência, a lipase é um seletivo de triglicerídio, conforme definido no presente.

Quando a enzima é uma lipase, o produto hidrolisado,
30 que pode ser um produto de lecitina hidrolisada, dotado de

50% ou A.I maior, contém, tipicamente, mono/diglicerídios, triglicerídios, e fosfolipídios, e pode ainda conter fosfolipídios hidrolisados, por exemplo, lisofosfolipídios. Exemplos de tais reações são dados abaixo, nas Seções V e 5 VI.

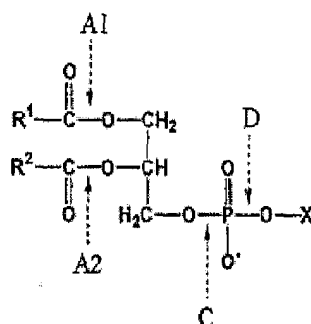
Em outra modalidade de enzima única, um material de partida derivado a partir de um óleo vegetal, que contenha fosfolipídios e triglicerídios, é reagido com uma lipase em um meio aquoso. O material de partida pode ser derivado a 10 partir de um processamento de óleo vegetal, especialmente óleo de soja, conforme supra descrito. Conforme acima, o material é derivado diretamente, de preferência, de uma fonte, isto é, não contém fosfolipídio adicionado externamente, triglicerídio, mono/diglicerídio, ou componentes de ácido 15 graxo. A lipase é preferivelmente uma lipase seletiva de triglicerídio, conforme descrito no presente.

As reações de enzima única ainda são contempladas onde a enzima é uma fosfolipase C. Novamente, o material de partida pode ser derivado a partir de um processamento de óleo vegetal, 20 especialmente óleo vegetal, e é, de preferência, derivado de forma direta de uma tal fonte. Espera-se que a reação produza um produto que contenha fosfolipídios, triglicerídios e diglicerídios, com nenhuma quantidade de monoglicerídios ou lisofosfolipídios significativa. Esse produto pode ser 25 adicionalmente reagido, caso desejado, com uma fosfolipase A, a fim de produzir um produto que contenha adicionalmente lisofosfolipídios.

III. Enzimas Adequadas para Uso nos Processos da Invenção

A. Fosfolipase

Conforme supra descrito, os métodos da invenção podem
 empregar uma fosfolipase para hidrolisar fosfolipídios (e,
 em alguns casos, triglicerídios) no material de partida. As
 enzimas de fosfolipase já estão disponíveis para
 5 comercialização. As fosfolipase comuns são divididas em
 categorias como A1, A2, C, e D com base em que cada ligação
 em um fosfolipídio é hidrolisado por enzimas, como indicado
 abaixo. (A família fosfolipase B de enzimas compartilham
 fosfolipase, lisofosfolipase e atividades de lisofosfolipase-
 10 transacilase (Shen et al., 2004) e são, em geral, menos
 preferidas devido a seletividade mais baixa.)



O presente processo de duas enzimas emprega,
 tipicamente, fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32) e/ou A2 (EC
 15 3.1.1.4), a qual produz lisofosfolipídios ao remover uma
 cadeia lateral de acila. Em outras modalidades, uma
 fosfolipase D (EC 3.1.4.4) pode ser usada, sozinha ou em
 combinação com fosfolipase A1 ou A2, a fim de proporcionar
 ácidos fosfatídicos e/ou ácidos lisofosfatídicos.

20 Em uma modalidade adicional, a fosfolipase C pode ser
 reagida com o material de partida de fosfolipídio/triglicerídio
 a fim de produzir um produto que contenha fosfolipídios,
 triglicerídios e diglicerídios, com uma quantidade de
 monoglicerídios ou lisofosfolipídios que não seja

significante. Esse produto pode ser adicionalmente reagido, se desejado, com uma fosfolipase A, a fim de produzir um produto que contenha adicionalmente lisofosfolipídios.

Em modalidades selecionadas, a fosfolipase D é usada sozinha ou em combinação com a fosfolipase A1 ou A2 a fim de produzir produtos de lecitina hidrolisada dotados de um ácido fosfatídico ou componente de ácido lisofosfatídico. Pode-se usar, ainda, em combinação com um álcool selecionado a partir de etanol amina, serina, e inositol, respectivamente, o conteúdo de PE, PS ou PI do produto de lecitina hidrolisada.

A hidrólise de lecitinas com fosfolipase A1 ou A2 sozinhas é conhecida na técnica. Veja, por exemplo, a Patente número GB 1215868 (1970), a qual descreve um processo convencional no qual a lecitina é reagida com a fosfolipase A2 em emulsão aquosa, na presença de íons de cálcio, a fim de proporcionar liso lecitina. A purificação inclui a extração com acetona, que remove materiais solúveis de acetona, tais como ácidos graxos e glicerídios. Hirai et al., (Patente número U.S. 5.955.327) descreve a reação de lecitina hidratada com fosfolipase A1 ou A2 em meio aquoso, seguido de separações com acetona para isolar o produto liso lecitina. Yesair (Patente número U.S. 5.716.814) descreve um processo no qual uma mistura de fosfatidil colina e um monoglicerídio são reagidos com fosfolipase A2, para produzir uma composição de ácido graxo lisofosfolipídio-monoglicerídio.

Em alguns casos, conforme descrito acima, uma fosfolipase pode apresentar uma atividade de lipase significativa e/ou seletiva. Por exemplo, Mustranta et al.,

1995, supra citado, reportou que uma preparação de fosfolipase A1 (*A. niger*) obteve uma razão de 2:1 de atividade de lipase/fosfolipase em meio aquoso. Uma tal fosfolipase pode ser usada de triglicerídios hidrolisados
5 nos processos descritos no presente documento. Mais tipicamente, no entanto, uma lipase, tal como descrita abaixo, é usada para hidrolisar triglicerídios.

B. Lipases

Muitas lipases diferentes (também referidas como
10 hidrólases de triacilglicerol; EC 3.1.1.3), obtidas a partir de fontes animal, de planta, ou microbial, são conhecidas e/ou disponíveis para comercialização, muitas vezes, em forma imobilizada. Essas enzimas podem variar amplamente na atividade e seletividade; isto é, no grau de
15 atividade de lipase, atividade de fosfolipase, e/ou atividade de esterase representada por uma preparação enzimática particular.

A informação relativa a atividade e seletividade de uma preparação de lipase comercial, muitas vezes, será
20 proporcionada pelo fabricante. A atividade e seletividade enzimática, muitas vezes, variam com as condições de reação, por exemplo, se a reação é feita em um meio orgânico ou aquoso, se a enzima é imobilizada, etc., e com a pureza de uma preparação particular. Outros parâmetros
25 que podem afetar a reatividade e seletividade de uma enzima inclui o pH, concentração de substrato, e polaridade do solvente (vide, por exemplo, Haas et al., 1995, 1994; supra citado).

A atividade de uma preparação enzimática particular
30 com relação aos substratos diferentes, tais como

fosfolipídios e triglicerídios, pode ser avaliada empiricamente por determinadas condições de reação, caso desejado, ao usar métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, A. Mustranta et al., (citado acima) determinou o grau de hidrólise de soja de fosfatidil colina (isto é, atividade de fosfolipase) para cada uma das diversas lipases e fosfolipase, em emulsão aquosa, ao triturar os ácidos graxos liberados produzidos por 30 minutos de reação. A reação similar com óleo de oliva foi usado a fim de determinar a atividade de lipase. Nesse relato, uma lipase *A. niger* e uma lipase *P. cyclopium*, ambas mostraram atividade de fosfolipase, muito embora a atividade de lipase ter sido maior, particularmente para a lipase *A. niger*. Descobriu-se ainda no relatório que as preparações de fosfolipase A2 são muito mais seletivas de fosfolipase do que as preparações de fosfolipase A1.

M. Haas et al., (1995, citado acima) determinou o grau de hidrólise de fosfolipídios e triglicerídios por cada uma das três lipases e uma fosfolipase, cada um disponível para comercialização na forma imobilizada. Os componentes foram tratados com enzimas separadamente na água; misturas de componentes foram tratadas em hexano saturado por água. Determinou-se o grau de hidrólise ao triturar os ácidos graxos liberados e através de análise de HPLC das misturas de lipídio de produtos. O meio solvente foi encontrado para ter um amplo efeito na reatividade e seletividade nesse relatório. Por exemplo, as lipases de *R. miehei* e *C. rugosa* eram muito mais reativas com relação aos triglicerídios que em relação aos fosfolipídios em ambos os meios solventes, e uma terceira lipase, da *C. antarctica*, mostrou seletividade

similar ao *R. meihei* na água, porém não era reativa no hexano. A fosfolipase (amano fosfolipase B) hidrolisou somente os fosfolipídios no hexano e era não reativa na água.

5 Em outra análise, F. Hara et al., (supra citado) determinou o grau de hidrólise do fosfatidil colina por várias lipases em um sistema micelar reverso por 24 horas e por 48 horas. O grau de hidrólise, determinado por análise cromatográfica, variada de 0 a 100% para as lipases
10 testadas. Por exemplo, sob as condições de reação descritas, as lipases derivas do *M. javanicus* (Lipase M10, Amano Pharmaceuticals), do *M. miehei* (Lipozyme IM20, Novo Nordisk), de pâncreas suíno (Pancreatin F, Amano) deram 100% de hidrólise de fosfatidil colina; lipases derivadas a
15 partir do *Rhizopus* sp. (Lipase F, Amano) e *R. delemar* (Newlase F, Amano) deram cerca de 35-45% de hidrólise; e lipases derivadas a partir de *A. niger* (Lipase A6, Amano) e *C. cylindrica* (Lipase AY30, Amano) deram pouca ou nenhuma hidrólise.

20 Conforme mostrado nos artigos e outros no campo supra citados, lipases muitas vezes apresentam atividade de fosfolipase significativa. Tais enzimas, as quais podem ser referidas como lipases "reativas a fosfolipídio" no presente, podem ser usadas como a primeira enzima nos
25 processos de duas enzimas descritos aqui. A lipase que é "reativa a fosfolipídio" pode ser definida como uma que, sob condições de reação adequadas, tais como aquelas apresentadas nas reações exemplificativas abaixo, é eficaz para hidrolisar pelo menos 1 mol %, de preferência pelo
30 menos 5%, e mais preferivelmente pelo menos 10% ou pelo

menos 25 mol % de fosfolipídios presentes na reação. Tais condições de reação podem incluir reação em um meio aquoso, que emprega 0,001 a 0,2% de enzimas baseadas em 60% de AI (insolúveis de acetona), a cerca de 40-60°C por 4 a 24
5 horas, em reação em um solvente orgânico, que emprega o mesmo nível de enzima, a cerca de 20-60°C por 1 a 24 horas.

Mais tipicamente, a primeira enzima na reação de duas enzimas é uma fosfolipase, e as lipases são empregadas como a segunda enzima nos processos de duas enzimas descritos
10 aqui, ou como a enzima única em processos que objetivam a hidrólise seletiva do componente triglicerídico do material de partida. Para esses propósitos, pode-se definir as lipases preferidas como aquelas que, sob determinadas condições de reação, são seletivas para a atividade de
15 lipase, isto é, o grau de hidrólise de acil gliceróis pela lipase é maior, de preferência, por um fator de dois ou mais que o grau de hidrólise de acil fosfolipídios pela lipase, sob as condições da reação. (Conforme notado acima, as condições de reação incluem, por exemplo, solvente,
20 estado da enzima (por exemplo, se está imobilizada ou não), temperatura, pH, presença e concentração de aditivos iônicos, e concentração de substrato.) Pode-se definir "grau de hidrólise" como a porcentagem de mol do substrato hidrolisado, isto é, porcentagem de triglicerídios
25 convertidos em mono/diglicerídios, ou porcentagem de fosfolipídios convertidos em lisofosfolipídios. Mais preferivelmente, o grau é cerca de 5 vezes maior, mais preferivelmente cerca de 25 ou cerca de 50 vezes maior. Essas enzimas são também referidas no presente como lipases

"seletivas de triglicerídio", ou lipases eficazes para hidrolisar seletivamente triglicerídios.

C. Imobilização de Enzimas

As enzimas usadas nos processos descritos aqui podem
5 ser imobilizadas, para os diversos materiais e métodos que
são conhecidos na técnica; procedimentos exemplificativos
são descritos abaixo. Imobilização de enzimas, em geral,
prolonga a vida útil das enzimas, simplifica a purificação
dos produtos, e muitas vezes intensifica a atividade de
10 catalítica da enzima. Os materiais para os quais enzimas
foram imobilizadas incluem sílica, vidro poroso, Celite®, terra
diatomácea, resinas de troca de íon, e outros vários substratos
poliméricos que incluem poliamidas, polipropileno, polietileno
glicol, polissacarídios tais como celulose, agarose, e agarose
15 modificada por alquila e quitina ou quitosano. Proporciona-se
substratos poliméricos, por exemplo, na forma de membranas,
fibras côncavas, ou gotas. Em uma modalidade, uma membrana
usada para separação dos ácidos graxos na reação também
poderia ser usada para a imobilização das enzimas. A
20 imobilização é freqüentemente alcançada através da simples
adsorção, porém pode incluir fixação equivalente, por
exemplo, ao amino ou sílica modificada por aldeído.

A literatura disponibiliza vastas descrições sobre a
imobilização enzimática, inclusive a descrição particular
25 sobre a imobilização de lipase e fosfolipase, estão
disponíveis na literatura. Uma amostragem de referências inclui
K. Mosbach, ed., 1988; F.X. Malcata et al., 1990, 1992;
V.M.Balcao et al., 1995; A.E.Ivanov et al., 1997;
G.F.Bickerstaff, ed., 1997; Bastida et al., 1998; R. Fernandez-
30 Lafuente et al., 1998; W.Cho et al., 1999; U.T.Bornscheuer et

al., 2002; M.V.Ramachandra et al., 2002; e D.Adlercreutz et al., 2002; todos citados em "Referências". As enzimas são freqüentemente fornecidas para comercialização na forma imobilizada.

5 IV. Produto Hidrolisado

A invenção ainda proporciona um produto hidrolisado, obtido via uma reação de hidrólise enzimática descrita aqui, que contém fosfolipídios e/ou fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios, e diglicerídios, e contém, tipicamente, fosfolipídios e
10 triglicerídios. Os fosfolipídios hidrolisados podem incluir lisofosfolipídios, ácido fosfatídico, e/ou ácido lisofosfatídico. Os fosfolipídios hidrolisados são, tipicamente, lisofosfolipídios, tais como são produzidos por reação de fosfolipase A1 ou A2.

Em diversas modalidades, o produto hidrolisado contém
15 pelo menos 0,5%, pelo menos 1%, pelo menos 2,5%, pelo menos 7,5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, ou pelo menos 45% por peso de mono/diglicerídios. A porcentagem de mol de triglicerídios convertidos em mono/diglicerídios é, de
20 preferência, pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 50%, até 75% ou maior.

Os produtos dos processos descritos no presente são nomeados "lecitina hidrolisada" ou "produtos de lecitina hidrolisada", se a composição dos mesmos estiver de acordo
25 com os padrões de classificação para as lecitinas, que pode variar de acordo com o país. Por exemplo, de acordo com a classificação padrão E322 na Europa, as "lecitinas" são definidas como "misturas de frações de fosfolipídios, os quais são obtidos a partir de gêneros alimentícios animal
30 ou vegetal, através de processos físicos"; estas podem

incluir "substâncias hidrolisadas que podem ser obtidas através do uso de enzimas inofensivas e adequadas". De acordo com esta classificação padrão, uma "lecitina" inclui pelo menos 60% de substâncias insolúveis de acetona e tem
5 um valor ácido menor que 35 mg de KOH/grama, e uma "lecitina hidrolisada" inclui pelo menos 56% de substâncias insolúveis de acetona e tem um valor ácido menor que 45 mg de KOH/grama.

O produto de lecitina hidrolisada da invenção pode ser
10 derivado a partir de um material de partida de lecitina que contenha misturas de fosfolipídios obtidos a partir de gêneros alimentícios animal ou vegetal, através de processos físicos. Um material de partida de lecitina pode ser obtido, por exemplo, a partir de degomagem por água ou
15 degomagem membranar de óleo de soja cru.

O produto hidrolisado da invenção consiste essencialmente de componentes de material de partida, o qual é derivado, diretamente, de um óleo vegetal, e substâncias hidrolisadas que são obtidas a partir do
20 material de partida através do uso de enzimas inofensivas e adequadas, especificamente, uma lipase e, na maioria dos exemplos, uma fosfolipase, como descrito aqui. O material de partida é, de preferência, um material de lecitina, obtido através da degomagem de um óleo vegetal, tal como
25 óleo de soja. O termo "consiste essencialmente de" significa que o produto hidrolisado pode conter, por exemplo, água, porém este não contém componentes lipídeos diferente dos componentes de material de partida e substâncias hidrolisadas derivadas dos mesmos, como

especificado acima. Este não contém atividade enzimática residual.

V. Procedimentos de Reações Exemplificativas

As reações que se seguem são apenas exemplificativas e não pretendem limitar a invenção. Esses procedimentos, se referem, tipicamente, a um material de partida de "lecitina"; no entanto, conforme notado acima, os materiais de partida que contêm quantidades variantes de fosfolipídios e triglicerídios podem ser usados. Por exemplo, um retentado oriundo de um processo de degomagem membranar pode incluir cerca de 10% a cerca de 85% de fosfolipídios, dependendo das condições de separação, como notado acima.

A. Reação em Meio Aquoso; Adição Seqüencial de Duas Enzimas

Uma lecitina de fluido, dotada de um nível de insolúvel de acetona (AI) de 55%-75%, é combinada com água, em uma quantidade de 0,1% a 10%, de preferência, cerca de 5-8% baseada em 60% de AI, e fosfolipase A2, em uma quantidade de 0,001 a 0,2% baseada em 60% de AI. Enquanto a quantidade de enzima usada é dependente da atividade de enzima particular, uma quantidade típica de Lecitase™ empregada seria cerca de 0,017%. Se necessário, o pH é ajustado à um nível favorável para a enzima, e CaCl_2 é adicionado para ativar a enzima. O excesso de CaCl_2 pode ser usado para separar, de modo eficiente, os ácidos graxos liberados. Realiza-se a reação a cerca de 40-60°C por 4 a 24 horas. O ressecamento proporciona um produto que contém lisolecitina, em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

Adiciona-se uma lipase à esse produto, em uma quantidade de 0,001 a 0,2%, de preferência, 0,1 a 0,2%

baseado em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH à um nível favorável para a enzima, e adiciona-se CaCl_2 . Realiza-se a invenção a cerca de 40-60°C por 4 a 24 horas. O ressecamento proporciona um produto de lecitina que
5 contém lisolecitina e contém, ainda, mono/diglicerídios, em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

De preferência, a concentração de lipase e outros parâmetros são eficazes para produzir um produto
10 hidrolisado que contenha pelo menos 0,5%, pelo menos 1%, pelo menos 2,5%, pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, ou pelo menos 45% por peso de mono/diglicerídios.

15 **B. Hidrólise em Solvente Orgânico; Adição Sequencial de Duas Enzimas**

Uma lecitina de fluido obtida como o retentado, a partir de um processo de degomagem membranar, conforme descrito, por exemplo, na Patente número U.S. 6.207.209,
20 que possui um nível de insolúvel de acetona (AI) de 55%-80%, é combinada com fosfolipase A2, a qual pode ser imobilizada, de preferência, em uma quantidade de 0,001 a 0,2%, baseada em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável para a enzima, e adiciona-se CaCl_2 para
25 ativar a enzima. O excesso de CaCl_2 pode ser usado para separar, de modo eficiente, os ácidos graxos liberados. Realiza-se a reação a cerca de 20-60°C por 1 a 24 horas. Recupera-se a enzima imobilizada, e o ressecamento proporciona um produto que contém lisolecitina, em uma

quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

Adiciona-se uma lipase à este produto, que pode ser imobilizado, de preferência, em uma quantidade de 0,001 a 5 0,2%, baseada em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável para a enzima, e adiciona-se CaCl_2 . Realiza-se a reação a cerca de 20-60°C por 1 a 24 horas. Recupera-se a enzima imobilizada, e o ressecamento proporciona um produto de lecitina que contém lisolecitina 10 e também contém mono/diglicerídios, em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

Em uma modalidade preferida, realiza-se a reação na presença de uma membrana dotada de uma composição e tamanho 15 de poro eficaz para remover de forma seletiva os ácidos graxos da mistura de reação.

De preferência, a concentração de lipase, e outros parâmetros são eficazes para produzir um produto de lecitina hidrolisado que contenha pelo menos 0,5%, pelo 20 menos 1%, pelo menos 2,5%, pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, ou pelo menos 45% por peso de mono/diglicerídios. A porcentagem de mol de triglicerídio convertido em 25 mono/diglicerídio é, de preferência, pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 50%, até 75% ou maior.

C. Hidrólise em Solvente Orgânico; Adição Simultânea de Duas Enzimas

Uma lecitina de fluido obtida como o retentado 30 originado de um processo de degomagem membranar, como

descrito, por exemplo, na Patente número U.S. 6.207.209, que possui um nível de insolúvel de acetona (AI) de 55%-80%, é combinada com fosfolipase A2 e uma lipase seletiva de triglicerídio, cada uma da qual pode ser imobilizada, de
5 preferência, cada uma em uma quantidade de 0,001 a 0,2%, baseada em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável para as enzimas, e adiciona-se o CaCl_2 . Realiza-se a reação a cerca de 20-60°C por 1 a 24 horas. Em uma modalidade preferida, a reação é realizada na presença
10 de uma membrana dotada de uma composição e tamanho de poro eficaz para remover, de modo seletivo, da mistura de reação, os ácidos graxos liberados.

Recupera-se a enzima imobilizada, e o ressecamento proporciona um produto de lecitina que contém lisolecitina
15 e mono/diglicerídios, cada um em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e respectiva concentração de enzima. De preferência, a concentração de lipase e outros parâmetros são eficazes para produzir um produto de lecitina hidrolisada que contenha pelo menos
20 0,5%, pelo menos 1%, pelo menos 2,5%, pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, ou pelo menos 45% por peso de mono/diglicerídios. A porcentagem de mol de triglicerídio convertido em
25 mono/diglicerídio é, de preferência, pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 50%, até 75% ou maior.

D. Reação em Meio Aquoso; Adição Sequencial de Duas Enzimas (Fosfolipase D e Lipase)

Uma lecitina de fluido dotada de um nível de insolúvel
30 de acetona (AI) de 55%-75% é combinado com água, em uma

quantidade de 0,1 a 10% baseada em 60% de AI, e fosfolipase D, em uma quantidade de 0,0001 a 0,5% baseada em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável de enzima, e adiciona-se CaCl_2 a fim de ativar a enzima.

- 5 Realiza-se a reação a cerca de 40-60°C por 4 a 24 horas. O ressecamento proporciona um produto que contém ácido fosfatídico, em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

Adiciona-se lipase a este produto, de preferência em
10 uma quantidade de 0,001 a 0,2%, baseado em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável para a enzima, adiciona-se CaCl_2 . Realiza-se a reação a cerca 40-60°C por 4 a 24 horas. O ressecamento proporciona um produto de lecitina que contém ácido fosfatídico e contém
15 ainda mono/diglicerídios, em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

De preferência, a concentração de lipase e outros parâmetros são eficazes para produzir um produto de
20 lecitina hidrolisada que contenha pelo menos 0,5%, pelo menos 1%, pelo menos 2,5%, pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, ou pelo menos 45% por peso de mono/diglicerídio. A porcentagem
25 de mol de triglicerídio convertido em mono/diglicerídio é, de preferência, de pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 50%, até 75% ou maior.

E. Reação em Meio Aquoso; Adição Sequencial de Fosfolipase D, Fosfolipase A2, e Lipase.

O primeiro estágio do processo descrito no item D acima, é realizado a fim de proporcionar um produto que contenha ácido fosfatídico, em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de
5 enzima.

Adiciona-se fosfolipase A2 à este produto, em uma quantidade de 0,001 a 0,2%, baseado em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável para a enzima, e adiciona-se CaCl_2 . Realiza-se a reação a cerca de
10 40-60°C por 4 a 24 horas. O ressecamento proporciona um produto de lecitina que contém lisofosfolipídio, ácido lisofosfatídico, e, opcionalmente, ácido fosfatídico, em uma quantidade determinada pelo tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

15 Adiciona-se uma lipase a este produto, em uma quantidade de 0,001 a 0,2%, de preferência 0,1 a 0,2% baseado em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável de enzima, e adiciona-se CaCl_2 . Realiza-se a reação a cerca de 40-60°C por 4 a 24 horas. O
20 ressecamento proporciona um produto de lecitina que contém lisofosfolipídios, ácido lisofosfatídico, e, opcionalmente, ácido fosfatídico, e que contém ainda mono/diglicerídios, em quantidades determinadas por tempo de reação e temperatura e concentração de enzima.

25 De preferência, a concentração de lipase e outros parâmetros são eficazes para produzir um produto de lecitina hidrolisado que contenha pelo menos 0,5%, pelo menos 1%, pelo menos 2,5%, pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos
30 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, ou

pelo menos 45% por peso de mono/diglicerídios. A porcentagem de molde triglicerídios convertidos em mono/diglicerídios é, de preferência, de pelo menos 25%, mais preferivelmente pelo menos 50%, até 75% ou maior.

5 Em uma variação de reações que emprega fosfolipases D, um álcool selecionado a partir de etanolamina, L-serina, inositol, e um sal de colina é incluído na mistura de reação com fosfolipase D, a fim de variar a distribuição de fosfolipídios (isto é, a razão PE/PS/PI/PC) no produto
10 final.

F. Hidrólise em Solvente Orgânico; Enzima Única

Uma lecitina de fluido obtida como o retentado, a partir do processo de degomagem membranar, conforme descrito, por exemplo, na Patente número U.S. 6.207.209,
15 dotada de um nível de insolúvel de acetona (AI) de 20-80%, é combinada com uma lipase seletiva de triglicerídio, a qual pode ser imobilizada, em uma quantidade de cerca de 0,1 a 0,2% baseado em 60% de AI. Se necessário, ajusta-se o pH a um nível favorável para a enzima, e adiciona-se o
20 CaCl_2 . O excesso de CaCl_2 pode ser usado para separar de forma eficiente os ácidos graxos liberados. Realiza-se a reação a cerca de 20-60°C por 1 a 24 horas. Em uma modalidade preferida, realiza-se a reação na presença de uma membrana dotada de uma composição e tamanho de poro
25 eficaz para remover da mistura de reação, de forma seletiva, os ácidos graxos liberados.

Recupera-se a enzima imobilizada, e o ressecamento proporciona um produto de lecitina que contém mono/diglicerídios, em uma quantidade determinada pelo
30 tempo de reação e temperatura e respectiva concentração de

enzima. De preferência, a concentração de lipase e outros parâmetros são eficazes para produzir um produto de lecitina hidrolisada que contenha pelo menos 0,5%, pelo menos 2,5%, pelo menos 5%, pelo menos 7,5%, pelo menos 10%,
5 pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 35%, pelo menos 40%, ou pelo menos 45% por peso de mono/diglicerídios. A porcentagem de mol de triglicerídio convertido em mono/diglicerídio é, de preferência, de pelo menos 25%, mais preferivelmente de
10 pelo menos 50%, até 75% ou maior.

VI. Exemplos de Trabalho

Os exemplos a seguir pretendem ilustrar e não limitar a invenção.

Imobilização de Enzimas

15 Pode-se realizar a imobilização de enzimas conforme descrito, por exemplo, em D.Adlercreutz et al., 2002. Dois conjugados, preparados conforme descrito abaixo, foram usados nos Exemplos que seguem.

Conjugado I: A Lecitase®Ultra foi imobilizada no
20 MP1000 (Membrana, Accurel Systems, Obernburg, Alemanha), como se segue. O MP1000 (3g) foi molhado usando 25 ml de etanol (95%), e 2,5 ml de Lecitase®Ultra (uma Fosfolipase A) em 350 ml 20 mM de tampão de fosfato (pH 7) foi adicionado. Após 1 hora de movimentado a 0°C, a enzima
25 imobilizada foi isolada através de filtração e seca a uma pressão reduzida.

Conjugado II: Em um procedimento similar, o MP1000 (15g) foi molhado usando 100 ml de etanol (95%), e 7,5 ml de Lecitase®Ultra em 350 ml 20 mM de tampão de fosfato (pH
30 7) foi adicionado. Após 1 hora de movimentado a 0°C, a

enzima imobilizada foi isolada através de filtração e seca a uma pressão reduzida.

Exemplo I: Hidrólise de Lecitina com Fosfolipase A

Um retentado de lecitina de fluido do processo de
5 degomagem membranar, conforme descrito, por exemplo, na Patente número 6.207.209, dotado de um nível de insolúvel de acetona (AI) de 55%-80%, foi recriada ao dissolver 106,4g de lecitina (AI: 65,13, AV: 17,89 mg de KOH/g), obtido ao secar o tal retentado, e 14,08g de água em 564,5g
10 de hexano.

Essa solução (60ml) foi combinada com 200mg de Lecitase®Ultra imobilizada (conjugado I, preparado como supra descrito.) Realizou-se a reação em uma temperatura ambiente por 20 horas, e a enzima imobilizada foi recuperada através de
15 filtração. O ressecamento proporcionou um produto dotado de um valor ácido de 35,1 mg de KOH/g e a composição seguinte (por valor ácido, P-NMR e GC): 17,8% de ácidos graxos, 0,1% de monoglicerídeos, 0,6% de diglicerídeos, 26,2% de triglicerídeos, 42,0% de fosfolipídios e 2,5% de lisofosfolipídios.

20 **Exemplo II: Reação Seqüencial de Duas Enzimas**

Um retentado de lecitina de fluido de um processo de degomagem membranar, como descrito, por exemplo, na Patente número 6.207.209, possui um nível de insolúvel de acetona (AI) de 55%-80%, foi recriado ao dissolver 106,4g de
25 lecitina (AI: 65,13, AV: 17,89mg de KOH/g), obtida ao secar o tal retentado, e 14,08h de água em 564,5g de hexano.

Essa solução (60ml) foi combinada com 200mg de Lecitase®Ultra imobilizada (conjugado I, preparado conforme supra descrito.) Realizou-se a reação em temperatura ambiente

por 20 horas, e a enzima imobilizada foi recuperada através de filtração.

Adicionou-se 20 mg de Lipozyme a essa filtração. Realizou-se a reação em temperatura ambiente por 4 horas, e a enzima imobilizada foi recuperada através de filtração. O ressecamento proporcionou um produto dotado de um valor ácido de 62,5 mg de KOH/g e a composição seguinte (de valor ácido, P-NMR e GC): 31,5% de ácidos graxos, 2,3% de monoglicerídios, 5,7% de diglicerídios, 9,4% de triglicerídios, 30,8% de fosfolipídios e 8,4% de lisofosfolipídios.

Exemplo III: Reação Simultânea de Duas Enzimas

Um retentado de lecitina de fluido de um processo de degomagem membranar, como descrito, por exemplo, na Patente número 6.207.209, dotado de um nível de insolúvel de acetona (AI) de 55%-80%, foi recriado ao dissolver 106,4 de lecitina (AI: 65,13, AV: 17,89mg de KOH/g), obtida ao secar o tal retentado, e 14,08g de água em 564,5g de hexano.

Essa solução (60ml) foi combinada com 200mg de Lecitase®Ultra imobilizada (conjugado II, preparado como supra descrito) e 10mg de Lipozyme. Realizou-se a reação em temperatura ambiente por 8 horas, e a enzima imobilizada foi recuperada através de filtração. O ressecamento proporcionou um produto dotado de valor ácido de 54,3mg de KOH/g e a composição seguinte (de valor ácido, P-NMR e GC): 27,3% de ácidos graxos, 3,8% de monoglicerídios, 5,4% diglicerídios, 3,1% de triglicerídios, 44,6% de fosfolipídios e 1,9% de lisofosfolipídios.

Exemplo IV: Reação Simultânea de Duas Enzimas

O procedimento do Exemplo III foi repetido, usando 100 mg do conjugado II ao invés de 200 mg. O ressecamento proporcionou

um produto dotado de composição seguinte (de valor ácido, P-NMR e GC): 26% de ácidos graxos, 3,6% de monoglicerídeos, 5,2% de diglicerídeos, 3,1% de triglicerídeos, 46% de fosfolipídios e 1,1% de lisofosfolipídios.

5 **Exemplo V: Reação Simultânea de Duas Enzimas**

Repetiu-se o procedimento do Exemplo III, usando 400mg do conjugado II ao invés de 200mg. O ressecamento proporcionou um produto dotado de uma composição seguinte (por valor ácido, P-NMR e GC): 30,8% de ácidos graxos, 3,9% de monoglicerídeos, 4,3%
10 de diglicerídeos, 2,4% de triglicerídeos, 43,6% de fosfolipídios e 2,6% de lisofosfolipídios.

Exemplo VI: Hidrólise de Lecitina como uma Lipase

Um retentado de lecitina de fluido do processo de degomagem membranar, como descrito, por exemplo, na Patente
15 número 6.207.209, dotado de um nível de insolúvel de acetona (AI) de 55%-80%, foi recriado ao dissolver 106,4g de lecitina (AI: 65,13, AV: 17,89 mg de KOH/g), obtido ao secar o tal retentado, e 14,08g de água em 564,5g de hexano.

20 Essa solução (60ml) foi combinada com 10mg de Lipozyme. Realizou-se a reação em temperatura ambiente por 20 horas, e recuperou-se a enzima imobilizada através de filtração. O ressecamento proporcionou um produto dotado de um valor ácido de 52,1 de KOH/g e a composição seguinte (de valor ácido, P-NMR e
25 GC): 26,2% de ácidos graxos, 4,0% de monoglicerídeos, 5,3% de diglicerídeos, 3,8% de triglicerídeos, 47,4% de fosfolipídios e 0,8% de lisofosfolipídios.

As Tabelas I e II abaixo resumem os resultados das reações supra descritas. (PL = fosfolipídios; LPL = lisofosfolipídios;
30 TG = triglicerídeos; DG = diglicerídeos; MG = monoglicerídeos; FA

= ácidos graxos.) A Tabela I mostra a distribuição de componentes no produto hidrolisado, por porcentagem de peso. A Tabela II mostra a razão molar aproximada de triglicerídios, diglicerídios e monoglicerídios (baseado no peso molecular de um 5 esterol glicerídio) no produto hidrolisado, relativa a soma desses três componentes. Como pode se ver, a porcentagem de mol de triglicerídio convertido em mono/diglicerídio, em todos os Exemplos, exceto o I, é cerca de 60% ou maior, até cerca de 85%.

Tabela I

Exemplo	Enzima(s)	Valor ácido do produto	Componentes do produto, p/p					
			PL	LPL	TG	DG	MG	FA
I	Lecitase preparada com 200mg	35,1	42,0	2,5	26,2	0,6	0,1	17,8
II	Lecitase preparada com 200mg, seguida de Lipozyme 20mg	62,5	30,8	8,4	9,4	5,7	2,3	31,5
VI	Lipozyme 10mg	52,1	47,4	0,8	3,8	5,3	4,0	26,2
IV	Lecitase preparada com 100mg + Lipozyme 10mg	n.d.	46,0	1,1	3,1	5,2	3,6	26,0
III	Lecitase preparada com 200mg + Lipozyme 10mg	54,3	44,6	1,9	3,1	5,4	3,8	27,3
V	Lecitase preparada com 400mg + Lipozyme 10mg	n.d.	43,6	2,6	2,4	4,3	3,9	30,8

Tabela II

Exemplo	Enzima(s)	Razão molar de TG/DG/MG		
		% de mol aproximada de TG	% de mol aproximada de DG	% de mol aproximada de MG
I	Lecitase preparada com 200mg	96%	3%	1%
II	Lecitase preparada com 200mg, seguida por Lipozyme 20mg	40%	35%	25%
VI	Lipozyme 10mg	18%	36%	46%
IV	Lecitase preparada com 100mg + Lipozyme 10mg	16%	38%	46%
III	Lecitase preparada com 200mg + Lipozyme 10mg	15%	38%	47%
V	Lecitase preparada com 400mg + Lipozyme 10mg	13%	34%	53%

VII. Aplicações

Os produtos hidrolisados, inclusive os produtos de lecitina hidrolisada, preparados de acordo com a invenção podem ser

5 usados em qualquer aplicação onde a lecitina, lecitina hidrolisada, lecitina fortificada com mono/diglicerídios, ou produtos relacionados foram usados. Os produtos hidrolisados da invenção podem ser formulados em tais produtos, de acordo com métodos conhecidos na técnica para formulação de lecitina ou

10 lecitina hidrolisada.

O produto hidrolisado por ser usado, por exemplo, como um emulsificante, tensoativo, estabilizador, agente liberador, agente umectante, agente dispersor, lubrificante, agente controlador de viscosidade, agente de cristalização, agente
5 amaciante, emoliente, agente anti-sujeira, ou ingrediente altamente nutritivo.

Várias aplicações, nas quais o produto hidrolisado pode ser usado, incluem aplicações alimentícias nutritivas, técnicas, cosméticas, e farmacêuticas/nutracêuticas. Aplicações
10 alimentícias exemplificativas incluem chocolate, derivados de chocolate, panificação, confeitaria, glacês, produtos diários, produtos de queijo, produtos de massa, margarina, manteiga, misturas gordurosas, emulsões, óleos de spray, cobertura, instantaneidade do cacau, leite, pós de proteína não-diária,
15 agentes liberadores, sopas, condimentos, maioneses, coberturas, carnes, molhos, carnes enlatadas, análogos de carnes, agentes melhoradores de pão, bebidas, bebidas energéticas, lanches, sobremesas (tais como sorvete e barras), melhoradores de farinha, melhoradores de pão, chicletes, corantes, misturas
20 aromatizantes, misturas de emulsificantes, comida para bebês, e antioxidantes.

Em uma modalidade particular, produtos de lecitina hidrolisada da invenção, que contém mono/diglicerídios, são úteis para melhorar propriedades de antisustentação em
25 produtos utilizados em cozimento, tais como margarina ou manteiga. Conforme proporcionado no presente, tais produtos são formados, de preferência, através de hidrólise de um material de partida de lecitina com uma lipase, sozinha ou em combinação com uma fosfolipase.

Aplicações alimentícias exemplificativas incluem emulsificantes e fontes de alto valor nutricional em alimentos para, por exemplo, peixe, camarão, bezerros (como substituto do leite), porcos, porcas, leitões, pele de
5 vison, aves domésticas e animais domésticos. Aplicações técnicas exemplificativas incluem o uso como um agente dispersor em, por exemplo, pinturas, tintas, revestimentos, fitas magnéticas, e discos, como um agente amaciante em, por exemplo, couro e têxteis, como um emulsificante, em por
10 exemplo, proteção de safra e agroquímicos, ou em lubrificantes, óleos, adesivos, absorventes, floculante, inibidores de corrosão, cerâmicas, vidro, detergentes, processamento de metal, produtos de papel, produtos de petróleo, fotocópia, fotografia, polímeros, borrachas, e
15 têxteis. As aplicações cosméticas exemplificativas incluem o uso como um agente dispersor em batom e polimento da unha e como um emulsificante/estabilizador em xampus, cremes, e loções. As aplicações farmacêuticas/nutracêuticas exemplificativas incluem o uso como uma fonte natural de fosfolipídios, tais como
20 fosfatidil colina e vitamina E.

Dessa maneira, a invenção inclui, adicionalmente, métodos de formulação de um produto hidrolisado, particularmente um produto de lecitina hidrolisada, conforme preparado por qualquer dos métodos da invenção descritos no presente documento, em um
25 produto como descrito acima, e particularmente em um produto alimentício. A invenção direciona-se, ainda, a um produto, especialmente um produto alimentício, que contém um produto hidrolisado, particularmente um produto de lecitina hidrolisada, conforme preparado por qualquer um dos métodos da invenção aqui
30 descritos.

REIVINDICAÇÕES

1. Método de produção de um produto de lecitina hidrolisada que compreende fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios e diglicerídios, o método **caracterizado** por
5 compreender:

(a) colocar um material de lecitina, que compreende um componente de fosfolipídio e um componente de triglicerídio, em contato com uma primeira enzima para criar uma mistura de reação em um meio solvente orgânico
10 compreendendo um solvente orgânico aprótico, em que o dito solvente é um solvente de hidrocarboneto, e água suficiente para promover hidrólise, em que a primeira enzima é fosfolipase A1, fosfolipase A2, fosfolipase C ou fosfolipase D que hidrolisa os fosfolipídios;

15 (b) subsequentemente, colocar o produto da etapa (a), em um meio solvente orgânico contendo água suficiente para promover hidrólise, em contato com uma segunda enzima que é Lipozyme que hidrolisa os triglicerídios; e

(c) obter o produto de lecitina hidrolisada.

20 2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente é hexano.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que as etapas (a) e (b) são conduzidas na presença de uma membrana que separa os
25 fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios e diglicerídios dos ácidos graxos liberados.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina é compreendido de pelo menos 40% do componente de
30 fosfolipídio.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina compreende pelo menos 60% de material insolúvel de acetona.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina compreende um retentado de um processo de degomagem membranar de óleo vegetal.

7. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina hidrolisado compreende pelo menos 56% de materiais insolúveis de acetona e tem um valor ácido menor que 45 mg de KOH/grama.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina hidrolisada compreende pelo menos 60% de materiais insolúveis de acetona.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é fosfolipase A1.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é fosfolipase A2.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é fosfolipase C.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é fosfolipase D.

13. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que compreende ainda, antes da

etapa de contato (b), a reação do produto da etapa (a) com fosfolipase A1 ou fosfolipase A2.

14. Método de produção de um produto de lecitina hidrolisada que compreende fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios e diglicerídios, o método **caracterizado** por compreender:

colocar um material de lecitina, que compreende um componente de fosfolipídio e um componente de triglicerídio, em contato com primeira e segunda enzimas, em uma mistura de reação contendo um solvente orgânico aprótico, em que o dito solvente é um solvente de hidrocarboneto, e água suficiente para promover hidrólise; em que a primeira enzima é fosfolipase A1, fosfolipase A2, fosfolipase C ou fosfolipase D que hidrolisa os fosfolipídios, e a segunda enzima é Lipozyme que hidrolisa os triglicerídios; e obter o produto de lecitina hidrolisada a partir da mistura de reação.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de contato é conduzida na presença de uma membrana que separa os fosfolipídios hidrolisados, monoglicerídios e diglicerídios dos ácidos graxos liberados.

16. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o solvente é hexano.

17. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina é compreendido de pelo menos 40% do componente de fosfolipídio.

18. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina

compreende pelo menos 60% de material insolúvel de acetona.

19. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina compreende um retentado de um processo de degomagem
5 membranar de óleo vegetal.

20. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina hidrolisada compreende pelo menos 56% de materiais insolúveis de acetona e tem um valor ácido menor que 45 mg
10 de KOH/grama.

21. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina hidrolisada compreende pelo menos 60% de materiais insolúveis de acetona.

15 22. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é fosfolipase A1.

23. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é
20 fosfolipase A2.

24. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é fosfolipase C.

25 25. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que a primeira enzima é fosfolipase D.

26. Método, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina é colocado em contato com a primeira e a segunda enzimas
30 simultaneamente.

27. Método de produção de um produto que compreende fosfolipídios, monoglicerídios e diglicerídios por hidrólise enzimática, o método **caracterizado** por compreender:

5 colocar um material de lecitina, que compreende um componente de fosfolipídio e um componente de triglicerídio, em contato com Lipozyme na ausência de uma fosfolipase para criar uma mistura de reação em um meio solvente orgânico compreendendo um solvente orgânico aprótico, em que o dito solvente é um solvente de
10 hidrocarboneto, e água suficiente para promover hidrólise, para hidrolisar seletivamente os triglicerídios; e obter o produto de lecitina hidrolisada a partir da mistura de reação, em que o material de lecitina é um retentado de um
15 processo de degomagem membranar de óleo vegetal.

28. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina é compreendido de pelo menos 40% do componente de fosfolipídio.

20 29. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina compreende pelo menos 60% de material insolúvel de acetona.

30. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina
25 hidrolisada compreende pelo menos 56% de materiais insolúveis de acetona e tem um valor ácido menor que 45 mg de KOH/grama.

31. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina
30 hidrolisada compreende pelo menos 60% de materiais

insolúveis de acetona.

32. Método de produção de um produto que compreende fosfolipídios, monoglicerídios e diglicerídios, por hidrólise enzimática, o método **caracterizado** por
5 compreender:

colocar um material de lecitina, que compreende um componente de fosfolipídio e um componente de triglicerídio, em contato com Lipozyme na ausência de uma fosfolipase para criar uma mistura de reação em um meio
10 solvente orgânico compreendendo um solvente orgânico aprótico, em que o dito solvente é um solvente de hidrocarboneto, e água suficiente para promover hidrólise, para hidrolisar seletivamente os triglicerídios; e

obter o produto de lecitina hidrolisada a partir da
15 mistura de reação, em que a etapa de colocar em contato é realizada na presença de uma membrana eficaz para separar os fosfolipídios, monoglicerídios e diglicerídios a partir dos ácidos graxo liberados.

33. Método, de acordo com a reivindicação 32,
20 **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina é compreendido de pelo menos 40% do componente de fosfolipídio.

34. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que o material de lecitina
25 compreende pelo menos 60% de material insolúvel de acetona.

35. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina hidrolisada compreende pelo menos 56% de materiais insolúveis de acetona e tem um valor ácido menor que 45 mg
30 de KOH/grama.

36. Método, de acordo com a reivindicação 32, **caracterizado** pelo fato de que o produto de lecitina hidrolisada compreende pelo menos 60% de materiais insolúveis de acetona.

5 37. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o componente de fosfolipídio compõe de 50% a 85% do retentado.

38. Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que o componente de fosfolipídio
10 compõe de 50% a 85% do retentado.

39. Método, de acordo com a reivindicação 27, **caracterizado** pelo fato de que o componente de fosfolipídio compõe de 50% a 85% do retentado.