



(11) PI 0808024-0 B1



(22) Data do Depósito: 28/01/2008

(45) Data de Concessão: 16/05/2017

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

(54) Título: MÉTODO PARA DESENGOMAR UMA COMPOSIÇÃO DE ÓLEO

(51) Int.Cl.: C11B 3/00; C12N 9/16

(30) Prioridade Unionista: 11/09/2007 US 11/853339, 30/01/2007 US 11/668921

(73) Titular(es): BUNGE OILS, INC.

(72) Inventor(es): CHRISTOPHER L. G. DAYTON; ERIN MARIE ROSSWURM; FLAVIO DA SILVA GALHARDO

“MÉTODO PARA DESENGOMAR UMA COMPOSIÇÃO DE ÓLEO”

CAMPO DA INVENÇÃO

Este pedido diz respeito a um método enzimático para remover vários fosfolipídeos e lecitinas (conhecidos coletivamente como “gomas”) de óleos vegetais para produzir um produto de óleo ou gordura desengomado que pode ser usado para a produção de alimento e/ou aplicações não alimentícias. Mais particularmente, este pedido diz respeito a um método para o tratamento enzimático e remoção de vários fosfolipídeos e lecitinas, método este que pode ser praticado em óleos crus ou óleos desengomados em água. Em uma forma de realização, a reação enzimática ou período de tratamento pode ser menor do que cerca de uma hora.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os óleos vegetais brutos obtidos dos métodos de prensagem ou extração com solvente são uma mistura complexa de triacilgliceróis, fosfolipídeos, esteróis, tocoferóis, ácidos graxos livres, metais traço, e outros compostos menores. É desejável remover os fosfolipídeos, ácidos graxos livres e metais traço de modo a produzir um óleo de salada de qualidade com um sabor brando, cor clara e uma vida de prateleira longa.

A remoção de fosfolipídeos gera quase todas as perdas associadas com o refino de óleos vegetais. Como ilustrado na FIG. 1, os fosfolipídeos contém um grupo fosfato em uma das duas extremidades da cadeia principal de glicerol, ao passo que um triacilglicerol contém pelo menos um ácido graxo.

O grupo fosfato do fosfolipídeo é “hidrofílico” ou “gosta de água,” significando que o grupo funcional X é atraído para a água. As cadeias de ácido graxo do fosfolipídeo R1 e R2 são “lipofílicas” ou “gostam de lipídeo,” significando que elas são atraídas para os lipídeos. Visto que a molécula de fosfolipídeo possui tanto um grupo funcional hidrofílico quanto

cadeias de ácido graxo lipofílicas, a mesma é um excelente emulsificador natural.

O grupo funcional contendo fosfato do fosfolipídeo indicado na FIG. 1 como “X” determina o grau da sua natureza hidrofílica. O grupo funcional X na FIG. I pode ser qualquer um de diversos de uma variedade de tipos conhecidos, uns poucos dos quais são ilustrados na FIG. 2.

Os fosfolipídeos contendo os grupos funcionais -colina e -etanolamina têm a maior afinidade para água, enquanto que os ácidos, sais de ácidos (cálcio, magnésio e ferro) e - inositol têm afinidades muito mais baixas com a água. O ácido fosfatídico e os sais do ácido fosfatídico são habitualmente conhecidos como “Fosfolipídeos Não Hidratáveis” ou NHPs. Os fosfolipídeos são habitualmente medidos em óleo como “teor de fósforo” em partes por milhão. A Tabela 1 contém as quantidades típicas de fosfolipídeos presentes nas safras de sementes oleaginosas principais e a distribuição dos vários grupos funcionais como uma porcentagem dos fosfolipídeos presentes no óleo.

COMPOSIÇÃO DE FOSFOLIPÍDEO

| | Óleo de soja | Óleo de canola | Óleo de girassol |
|-------------------|--------------|----------------|------------------|
| P (ppm) | 400 - 1200 | 200 -- 900 | 300 - 700 |
| PC (-colina) | 12% - 46% | 25% - 40% | 29% - 52% |
| PE (-etanolamina) | 8% - 34% | 15% - 25% | 17% - 26% |
| PA (-ácido) | 2% - 21% | 10% - 20% | 15% - 30% |
| PI (-inositol) | 2% - 15% | 2% - 25% | 11% - 22% |

Tabela 1: Níveis típicos e distribuições de fosfolipídeo para sementes oleaginosas comuns.

Os fosfolipídeos podem ser parcial ou totalmente removidos de óleos vegetais através de diversos meios conhecidos diferentes. O processo mais habitualmente usado na indústria são desengomadura em água, desengomadura ácida, refino cáustico e desengomadura enzimática.

Desengomadura em Água

Esta técnica é usualmente aplicada aos óleos brutos contendo uma alta quantidade de fosfolipídeos hidratáveis. Devido às suas

características brandas, os fosfolipídeos obtidos podem ser usados como lecitina (um emulsificador natural). O óleo obtido a partir desta técnica é no geral aludido na indústria como sendo “desengomado,” a despeito de ser apenas parcialmente desengomado. Visto que o óleo desengomado em água 5 ainda contém altas quantidades de fosfolipídeos, especialmente fosfolipídeos não hidratáveis, o uso de outras técnicas de processo, tais como o refino cáustico ou desengomadura enzimática PLA1, pode ser requerido para produzir um óleo acabado, de alta qualidade tendo alta estabilidade e cor baixa.

10 No processo para desengomadura em água, a água (1 a 5 % p/p) é adicionada ao óleo bruto de 60 a 75°C com mistura vigorosa. O óleo é depois suavemente misturado de 15 a 60 minutos para ajudar a hidratação dos fosfolipídeos presentes no óleo. A hidratação dos fosfolipídeos ou “gomas” faz com que as gomas intumesçam e aglomerem como um floculante. O 15 floculante é uma emulsão ou mistura de gomas hidratadas e óleo. A emulsão tem uma gravidade específica mais alta do que aquela do óleo e pode ser separada por sedimentação, filtração ou a prática industrial de centrifugação. A centrífuga produz duas correntes, óleo desengomado em água e gomas úmidas. O processo para desengomadura em água remove predominantemente 20 apenas os fosfolipídeos hidratáveis. Os fosfolipídeos remanescentes (50 a 250 ppm), medidos como os sais do ácido fosfatídico e/ou P1, podem ser removidos em operações de processamento subsequentes.

As gomas úmidas separadas são uma mistura de óleo emulsificado contendo pelo menos uma molécula de triacilglicerol (ou óleo) 25 para cada duas moléculas de fosfolipídeo (ou goma). Este óleo emulsificado não pode ser fisicamente separado ou recuperado da emulsão e é considerado uma perda do processo. As gomas podem ser secadas e vendidas como uma lecitina grau alimentício, mas elas são habitualmente usadas como um subproduto em outras aplicações tais como ração animal ou em um processo

industrial, com valor econômico reduzido.

A perda de óleo através da emulsificação é significante, com um impacto negativo no equilíbrio econômico global no custo de processo do óleo refinado.

5 Desengomadura Ácida

Esta técnica é habitualmente aplicada aos óleos brutos quando a meta é a remoção total de fosfolipídeos. O óleo obtido é habitualmente chamado de “super-desengomado” ou “totalmente desengomado” na indústria.

10 O óleo bruto é tratado com 250 a 2000 ppm de ácido fosfórico ou ácido cítrico de 60 a 90°C com mistura vigorosa. O ácido é deixado reagir com os sais dos NHPs por um período de 10 a 90 minutos. O ácido melhora a natureza hidrofílica dos NHPs, ajudando assim na sua remoção. Água (1 a 5 % p/p) é depois adicionada ao óleo bruto tratado com ácido de 60 a 75°C com 15 mistura vigorosa. O óleo é depois suavemente misturado de 15 a 60 minutos para ajudar a hidratação dos fosfolipídeos. A hidratação dos fosfolipídeos ou “gomas” faz com que as gomas intumesçam e aglomerem como um floculante. O floculante é uma emulsão ou mistura de gomas e óleo hidratados. A emulsão tem uma gravidade específica mais alta do que aquela 20 do óleo e pode ser separada por sedimentação, filtração ou pela prática industrial da centrifugação. A centrífuga produz óleo desengomado por ácido e uma goma úmida. O processo para desengomadura ácida remove a maior parte dos fosfolipídeos, mas bastante ainda permanece (25 a 100 ppm) no óleo desengomado para requerer processamento adicional. Para aplicações 25 alimentícias, o óleo desengomado por ácido é habitualmente submetido ao branqueamento e desodorização, um processo conhecido na indústria como “refino físico”. As gomas tratadas com ácido não são mais utilizáveis para uma lecitina grau alimentício.

Como no processo para desengomadura em água, as gomas

separadas e secas no processo para desengomadura ácida contém pelo menos uma molécula de triacilglicerol (ou óleo) para cada duas moléculas de fosfolipídeo (ou goma). Este óleo emulsificado não pode ser fisicamente separado ou recuperado e é considerado uma perda de processo, com impacto 5 econômico negativo sobre o equilíbrio econômico global do custo de processo do óleo refinado.

Refino Cáustico

Esta técnica é habitualmente aplicada aos óleos brutos ou desengomados em água quando a meta é remover todos os fosfolipídeos e 10 ácidos graxos livres.

O Óleo bruto ou desengomado em água é tratado com 200 a 1000 ppm de ácido fosfórico ou ácido cítrico de 60 a 90 °C com mistura vigorosa. O ácido é deixado reagir com os sais dos NHPs de 10 a 90 minutos. 15 O ácido melhora a natureza hidrofílica dos NHPs, ajudando assim na sua remoção. Uma solução de hidróxido de sódio diluído (10 a 18 % p/p) é adicionada ao óleo tratado com ácido de 65 a 75°C. A quantidade de hidróxido de sódio (cáustico) é fundamentada na quantidade de ácidos graxos livres presentes no óleo assim como um excesso entre 0,05 a 0,20 % em uma 20 base seca. A solução cáustica neutraliza os ácidos graxos livres (produzindo sabões de sódio), neutraliza o excesso de ácido e com os sabões de sódio criados, ajuda na hidratação e emulsificação de todos os fosfolipídeos remanescentes.

A óleo/solução de hidróxido de sódio são misturados por aproximadamente 10 minutos depois separados por sedimentação, filtração ou 25 industrialmente pela centrifugação. A centrífuga produz um óleo tratado cáustico e sabão. O óleo tratado cáustico é depois “lavado” com 10 a 20 % de água amolecida de 90 a 95°C e mais uma vez centrifugada. O óleo da centrífuga é conhecido como “Refinado uma vez” e a água é habitualmente conhecida como “Água de lavagem”. Para aplicações alimentícias, o óleo

“refinado uma vez” é habitualmente submetido a branqueamento e desodorização para produzir óleo de salada. Uma alternativa para a lavagem com água é tratar o óleo tratado cáustico com um gel de sílica absorvente e filtrar os sabões residuais e fosfolipídeos não removidos na centrifugação 5 inicial.

Como com os processos de desengomadura em água e ácida, as gomas separadas e secas no processo de refino cáustico contém uma molécula de triacilglicerol (ou óleo) para cada duas moléculas de fosfolipídeo (ou goma). Este óleo emulsificado não pode ser fisicamente separado ou 10 recuperado e é considerado uma perda de processo. Adicionalmente, o hidróxido de sódio reagirá com o óleo neutro para formar sabões, desse modo reduzindo ainda o rendimento de óleo global com impacto econômico negativo no equilíbrio econômico global no custo de processo do óleo refinado.

15 Tratamento Enzimático

Já uma outra técnica de refino usada na indústria de óleo vegetal é “o refino enzimático” ou “desengomadura enzimática”. A desengomadura enzimática é usada quando a meta é a remoção total de fosfolipídeos. No geral, os tratamentos de desengomadura enzimáticos da 20 técnica anterior foram praticados em óleos que foram previamente desengomados por um dos outros métodos, tipicamente a desengomadura em água. Para aplicações alimentícias, o óleo desengomado por enzima é sequencialmente submetido ao branqueamento e desodorização, um processo conhecido na indústria como “refino físico.” A desengomadura enzimática 25 fornece um rendimento de óleo melhor do que o da desengomadura por água, ácido ou cáustica, com resultados econômicos melhorados.

A reação enzimática muda a natureza do fosfolipídeo, clivando algumas das partes do fosfolipídeo. Isto reduz as propriedades de emulsificação do fosfolipídeo, de modo que menos óleo é perdido quando as

gomas são separadas do óleo, economizando assim óleo. As enzimas que exibem atividade com os fosfolipídeos são habitualmente chamadas de “fosfolipases”. Os tipos de fosfolipase são fundamentados na posição na molécula de fosfolipídeo na qual a enzima reage e são conhecidos como

5 PLA1, PLA2, PLC e PLD. As posições na molécula de fosfolipídeo na qual os tipos diferentes de fosfolipases reagem são ilustrados na FIG. 3.

Pode ser observado na FIG. 3 que tipos diferentes de fosfolipases produzirão compostos diferentes na reação com os fosfolipídeos. Além disso, cada tipo de fosfolipase tem a sua própria taxa de reação e as suas
10 próprias condições de reação ótimas em termos de pH, % de água e temperatura. PLA quando usado sozinho no geral requer um tempo de reação de pelo menos cerca de 4 horas, enquanto PLC quando usada sozinha no geral requer um tempo de reação de cerca de uma hora. É conhecido que o tratamento enzimático deve ocorrer em um pH menor do que ou igual a 8, de modo a minimizar a saponificação do óleo indesejável, mas o PLA tem um pH de reação ótimo de 4,5, enquanto que PLC tem um pH de reação ótimo de 7,0. Cada enzima também tem tolerâncias térmicas diferentes. As enzimas PLA desnaturarão a cerca de 50°C enquanto que as enzimas PLC desnaturarão a cerca de 65°C.

20 As sequências de aminoácidos com atividade de fosfolipase são extensivamente relatadas na literatura e divulgadas nas patentes e algumas destas são relatadas ter atividade sobre os fosfolipídeos presentes em óleos vegetais. Tudo isto é conhecido na técnica.

Uma produto de enzima PLA 1 comercial com atividade de
25 fosfolipase é a fosfolipase A1 Lecitase® Ultra da Novozymes. Este produto é conhecido produzir liso-fosfolipídeos polares e ácidos graxos polares quando misturados com óleo desengomado com um tampão de ácido cítrico-NaOH aquoso de 1 a 1,5 % no $4,5 < \text{pH} < 7,0$ e $40^\circ\text{C} < T < 55^\circ\text{C}$, como descrito no Novozymes' Application Sheet Oils & Fats# 2002-185255-01 e 2002-05894-

03. O PLA1 seletivamente hidrolisa o ácido graxo oposto ao grupo funcional de fosfate na cadeia principal de glicerol, como ilustrado na FIG. 4.

A reação resultante produz um liso-fosfolipídeo e um ácido graxo. A molécula de liso-fosfolipídeo perdeu um grupo funcional hidrofílico

5 e o grupo álcool remanescente no sítio de reação é hidrofílico. Agora com dois sítios hidrofílicos, a molécula de liso-fosfolipídeo é solúvel em água e perdeu as suas propriedades de emulsificação. O processo para desengomadura PLA1 reduz assim as perdas de refino por não remover mais nenhum óleo neutro com as gomas e a única perda é a molécula de
10 fosfolipídeo original.

Embora a desengomadura enzimática ofereça vantagens significantes aos processadores de óleo, ela também possui certas desvantagens. Uma desvantagem é que a reação da enzima com os fosfolipídeos pode ser lenta e consumidora de tempo. Em particular, a reação

15 das enzimas de fosfolipase A com fosfolipídeos pode levar muitas horas, dependendo das variáveis de reação tais como pH, temperatura, concentrações relativas e condições de mistura. Tais tempos de reação prolongados podem ter um impacto negativo significante sobre o valor econômico global dos processos de desengomadura enzimática. Por causa da lentidão da reação de
20 PLA, a desengomadura enzimática é tipicamente realizada nas composições de óleo que foram primeiro submetidas à desengomadura em água. Assim, o óleo deve ser desengomado duas vezes para se obter um produto que tenha um nível de fósforo baixo o bastante para o seu uso pretendido.

É conhecido na técnica que as enzimas PLC reagem com um fosfolipídeo hidrolisando-se seletivamente o grupo funcional de fosfato, como mostrado na FIG. 5. A reação resultante produz um diacilglicerol (“DAG”) e um grupo fosfatídico. A molécula de diacilglicerol não tem mais o grupo funcional de fosfato e não precisa ser removido. O processo para desengomadura de PLC reduz a perda de refino pela retenção da molécula de

fosfolipídeo original, enquanto que remove apenas o grupo funcional de fosfato. Entretanto, PLC não reage com todos os fosfolipídeos presentes no óleo. No geral, PLC não reage com ácido fosfatídico (PA) ou inositol fosfatídico (PI), ilustrado na FIG. 2. Contudo, tanto PA quanto PI são 5 fosfatídeos não hidratáveis que permanecem no óleo depois da desengomadura em água. Assim o óleo tratado com PLC deve ser tratado ainda com cáustico para remover as gomas residuais.

É conhecido que certas PLCs reagirão apenas com certos grupos fosfatídicos. Por exemplo, uma PLC específica de PI, identificada 10 como PI-PLC, é conhecida.

É assim um aspecto da invenção fornecer um método para desengomadura enzimática de óleos em que a taxa de reação enzimática é mais rápida do que nos processos de desengomadura enzimática da técnica anterior.

15 É um outro aspecto da invenção fornecer um método para realçar a taxa de reação de uma enzima de fosfolipase A usada em um processo para desengomadura enzimática.

É ainda um outro aspecto da presente invenção fornecer um 20 método para desengomar uma composição de óleo em que fosfolipídeos tanto hidratável quanto não hidratável podem ser tratados em um único processo.

É ainda um outro aspecto da presente invenção fornecer tal desengomadura enzimática e métodos de tratamento em que a reação enzimática tem uma duração de menos do que cerca de uma hora.

As seguintes referências dizem respeito à técnica da 25 desengomadura enzimática de óleos.

A U.S. 5.264.367 concedida a Aalrust *et al.* descreve o uso de fosfolipases A1, A2 ou B para tratar óleo que foi primeiro refinado de 50 a 250 ppm de fósforo. A tecnologia descrita nesta patente é conhecida comercialmente como Enzymax®. A Aalrust estabelece que visto que estas

enzimas atacam a lecitina, “não faria nenhum sentido usar o método da invenção em óleos tendo um alto teor de lecitina, tais como óleo de soja bruto.” A reação é realizada em uma temperatura de 20 a 80°C, com ácido cítrico ou um sal deste em uma faixa de pH de 3 a 7. É estabelecido que a 5 enzima deve ser cuidadosamente distribuída no óleo, com a solução de enzima-água presente como gotículas menores do que 10 µm no diâmetro. A forma de medição e cálculos da média em peso não foram divulgados. Um emulsificador é usado para dissolver as fosfolipases obtidas a partir da pancreatina ou produtos do pâncreas, que contém gordura. Aalrust estabelece 10 que porque o óleo que é recuperado contém menos do que 5 ppm de fósforo, o mesmo é adaptável para ser fisicamente refinado a óleo comestível. Mais tarde, detalhes da tecnologia descrita por Aalrust foram divulgados em diversas publicações (Dahlke, K. e Eichelsbacher, Enzymax® e Alcon® - Lurgi's route to Physical Refining in Proceeding of the World Conference on 15 Oilseed and Edible Oil Processing, Istanbul, Turquia, 1996, ed. Kaseoglu, Rhee e Wilson; Dalke, K. *et al.*, First Experiences with Enzymatic Oil Refining, Inform, vol. 6, Nº 12, dezembro de 1995). Os dados divulgados nestas publicações para o teste industrial reforça o uso da tecnologia aludida em óleos com teor de P variando de 40 a 180 ppm e não mais alto. Também é 20 divulgado que o processo não requer nenhum equipamento especial. Todas as bombas, agitadores, misturadores e trocadores de calor, assim como a centrífuga, são de projeto padrão e podem ser procurados de vários fornecedores.” Dahlke, K. e Eichelsbacher, M., Enzymax® e Alcon® - Lurgi's route to Physical Refining in Proceeding of the World Conference on 25 Oilseed and Edible Oil Processing, Istanbul, Turquia, 1996, ed. Kaseoglu, Rhee e Wilson, página 56.

A U.S. 5.532.163 concedida a Yagi *et al.* divulga um método enzimático usando pelo menos 30 partes em peso de água e preferivelmente 50 a 200 partes em peso de água, por 100 partes em peso de óleo ou gordura,

para a reação das fosfolipases A1, A2 ou B com óleo contendo 100 a 10,000 ppm de fósforo. O óleo é depois lavado com 30 % a 200 % partes em peso de água ou solução aquosa ácida por 100 partes em peso de óleo ou gordura. A carga de água total requerida para utilizar o processo varia de 60 % a 400 % 5 p/p de óleo processado. A produção de um tal efluente grande em uma instalação industrial torna este método não econômico.

A U.S. 6.001.640 concedida a Loeffler *et al.* divulga um processo em que um ou mais componentes contendo fósforo contendo óleos vegetais são submetidos a uma mistura de fosfolipases obtidas de *Aspergillus*, 10 a mistura compreendendo uma enzima tendo atividade A1, atividade A2 ou ambas e uma enzima tendo atividade de lisofosfolipase. A patente estabelece que visto que a fosfolipase atacaria a lecitina, não é prático usar este método com óleos com um alto teor de lecitina, tais como óleo de soja bruto.

Loeffler *et al.* divulga que a reação enzimática deve ser 15 conduzida em um pH de menos do que 4 e com o tamanho da gota de emulsão estando abaixo de 20 μm . A forma de medição e os cálculos da média ponderada do tamanho da gota de emulsão não foram divulgados. A patente estabelece que o produto resultante terá P residual de 15 ppm ou menos. É conhecido na técnica que submeter o óleo a pH tão baixo quanto 4 ou mais 20 baixo, fará com que as gomas presentes no óleo se tornem hidratadas e separem do meio de reação. As gomas hidratadas atuarão como emulsificadores. tal que quando elas são separadas elas carregarão óleo com elas, causando assim perda de óleo. Nenhum dado sobre a perda de óleo nas gomas é apresentado.

25 A U.S. 6.103.505 concedida a Clausen *et al.* divulga a descoberta e atividade de certas fosfolipases (A1, A2 ou B) para o uso na remoção enzimática de fosfolipídeos e um método para produzir as enzimas. O processo para desengomadura enzimática utiliza o método descrito na US 5.264.367 sem nenhuma etapa de processo adicional.

5 A U.S. 6.127.137 concedida a Hasida *et al.* divulga a descoberta e atividade de certas fosfolipases capazes de remover ambos os grupos acila graxos presentes em uma molécula de fosfolipídeo quando misturada com óleo desengomado (50 a 250 ppm de fósforo) com 0,5 a 5 % de água, pH de 1,5 a 3, temperatura de 30 a 45°C e um tempo de 1 a 12 horas.

10 A U.S. 6.143.545 concedida a Clausen *et al.* divulga a descoberta e atividade de certas fosfolipases (A1, A2 ou B) para o uso na remoção enzimática de fosfolipídeos e um método para produzir as enzimas. O processo para desengomadura enzimática utiliza o método descrito na US 10 5.264.367 sem nenhuma etapa de processo adicional.

15 A U.S. 6.548.633 concedida a Edwards *et al.* divulga sequências de cDNA's que codificam proteínas secretadas. Na coluna 44, a patente estabelece que a proteína desta invenção pode ser usada na desengomadura enzimática de óleos vegetais como divulgado na U.S. 6.001.640, citada acima. A patente estabelece ainda no mesmo parágrafo que a proteína desta invenção pode ser combinada em um “coquetel” com outras enzimas para melhorar a utilização de ração em animais.

20 O Pedido de Patente U.S. Serial Nº 10/556.816 de Dayton *et al.* divulga um processo para desengomadura enzimática melhorado em que o pH da reação enzimática tamponada é diminuído até abaixo de 4,5 depois que a reação enzimática é completada, eliminando desse modo a obstrução do equipamento, particularmente dos trocadores de calor e da centrífuga de separação, que resultaria da precipitação de sais de cálcio e magnésio no pH ótimo requerido para a atividade da enzima.

25 A U.S. 2004/0005399 A1 de Chakrabarti *et al.* divulga um método enzimático utilizando uma adição única de enzima e sistema de tamponamento e um tempo de retenção/reação curto, seguido pelo branqueamento com 2 a 4 % de terra de branqueamento e 0 a 1 % de carbono ativado e depois remoção de cera para se obter um óleo com um teor de

fósforo de 5 ppm. Tanto o processo de branqueamento quanto o processo de remoção de cera removerão fósforo residual do óleo. Adicionalmente, Chakrabarti *et al.* estabelece que o óleo perdido para as gomas está na faixa de 30 a 40 % das gomas separadas, sugerindo que a reação enzimática não vai 5 até a conclusão, resultando em perdas de óleo altas devido à emulsificação do óleo nos fosfolipídeos removidos.

A U.S. 2005/0059130 A1 de Bojsen *et al.* divulga a descoberta e atividade de certas fosfolipases para o uso na remoção enzimática de fosfolipídeos e um método para produzir as enzimas. A publicação refere-se 10 ao tratamento de óleo vegetal para reduzir o teor de fosfolipídeos como divulgado na U.S. 5.264.367.

A U.S. 2005/0108789A1 de Gramatikova *et al.*, agora Patente U.S. Nº 7.226.771 pretende divulgar fosfolipases (por exemplo, enzimas de fosfolipase A, B, C, D patatina) que eficientemente cliva ligações de éster de 15 glicerolfosfato em óleos, tais como óleos vegetais, para gerar uma base fosforilada extraível em água e um diglicerídeo. No parágrafo 108, o pedido estabelece ainda que tais fosfolipases podem ser usadas para desengomadura enzimática de óleos vegetais e que as PLC's da invenção podem ser usados além ou no lugar de PLA1s e PLA2s na desengomadura de óleo comercial, 20 tais como no processo ENZYMAX®, onde fosfolipídeos são hidrolisados pelas PLA1 e PLA2. No parágrafo 474, o pedido estabelece que a PLC pode ser usada sozinha ou com PLA para remover fosfolipídeos não hidratáveis do óleo que anteriormente foi desengomado em água, mas não fornece condições de reação para o uso das duas enzimas juntas. Visto que as condições de 25 reação ótimas da enzima PLA e enzima PLC são diferentes, esta declaração no pedido sem nenhum exemplos de trabalho não ensina uma pessoa habilitada na técnica como usar enzimas PLA e PLC simultaneamente. O pedido estabelece ainda que as fosfolipases C, D1 e D2 podem ser utilizadas na desengomadura enzimática de óleos anteriormente desengomado e não

desengomado (bruto) e como uma ajuda para o refino cáustico.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção diz respeito a um método para desengomar uma composição de óleo, o método compreendendo

5 (a) fornecer uma composição de óleo contendo uma quantidade de fosfolipídeos,

(b) contactar a dita composição de óleo simultaneamente com uma ou mais enzimas de fosfolipase A e uma ou mais enzimas de fosfolipase C, sob condições suficientes para que as enzimas reajam com os fosfolipídeos 10 para criar produtos de reação de fosfolipídeo,

(c) separar os produtos de reação de fosfolipídeos da composição de óleo, a composição de óleo remanescente depois da separação sendo uma composição de óleo desengomada,

15 por meio do qual durante a etapa (b) a reação da dita uma ou mais enzimas de fosfolipase A ocorre em uma taxa mais rápida do que seria na ausência da dita uma ou mais enzimas de fosfolipase C. Em uma forma de realização preferida, a reação da etapa (b) continua por uma duração de menos do que cerca de uma hora.

A 20 quantidade de água necessária para o processo da presente invenção pode ser menor do que cerca de 5 % e vantajosamente pode ser reduzida a menos do que cerca de 3 % e preferivelmente a cerca de 1,5 a 2,0 %.

O 25 pH do sistema pode ser ajustado antes ou depois da adição de uma ou todas das enzimas à composição de óleo. O rendimento de óleo é maximizado com base na composição de fosfolipídeo contida no bruto.

Especificamente, esta invenção diz respeito a um método em que tanto uma enzima de Fosfolipase C (PLC) e uma enzima de Fosfolipase A (PLA) são usadas juntas em uma reação enzimática para remover fosfolipídeos presentes em óleo. Mais especificamente, esta invenção diz

respeito a adicionar em combinação uma Fosfolipase C (PLC) e/ou Fosfolipase C específica de Fosfatidil-Inositol (PI-PLC) com Fosfolipase A1 (PLA1) e/ou Fosfolipase A2 (PLA2) para maximizar o rendimento de óleo e reduzir a quantidade de produtos residuais produzidos. Surpreendentemente, 5 foi descoberto que as cinéticas das reações enzimáticas se processam muito mais rapidamente do que esperado quando as duas enzimas são usadas juntas do que quando cada uma é usada separadamente. Além disso, foi descoberto que as reações se processam mais rapidamente do que o esperado mesmo se as condições de reação não são otimizadas para pelo menos uma das enzimas. 10 Além disso, foi descoberto que a reação pode se processar em menos do que cerca de uma hora e pode se processar tão rapidamente quanto cerca de trinta minutos.

15 Vantajosamente, o óleo tratado pode ser um óleo bruto ou um óleo desengomado em água. As enzimas podem ser adicionadas ao óleo separadamente ou juntas, mas as duas enzimas estarão em contato simultâneo com o óleo. De acordo com a invenção. Os parâmetros da reação enzimática tais como concentração de água, temperatura, pH, tempo de agitação e concentração de enzima podem ser controladas para otimizar a reação para uma combinação de enzima particular em um sistema de óleo particular.

20 DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A FIG. 1 ilustra as estruturas químicas de fosfolipídeos genéricos e triacilgliceróis genéricos.

A FIG. 2 ilustra grupos funcionais e estruturas para os fosfolipídeos comuns.

25 A FIG. 3 ilustra as posições na molécula de fosfolipídeo em que os tipos diferentes de fosfolipases reagem.

A FIG. 4 ilustra a reação de um fosfolipídeo com uma enzima PLA1 e os produtos resultantes.

A FIG. 5 ilustra a reação de um fosfolipídeo com uma enzima

PLC e os produtos resultantes.

A FIG. 6 é um gráfico que resume os resultados dos Exemplos 13 a 30, em que o fósforo residual médio na amostra desengomada é plotado para cada nível de cada fator experimental que é avaliado.

5 A FIG. 7 é um gráfico que resume os resultados dos Exemplos 31 a 38, em que o fósforo residual médio na amostra desengomada é plotado para cada nível de cada fator experimental que é avaliado.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente invenção diz respeito a uma melhora em um processo para desengomar enzimaticamente uma composição de óleo. Os inventores, surpreendentemente, descobriram que usar uma combinação de enzimas pode melhorar as reações cinéticas da clivagem de fosfolipídeo. Em particular um processo para desengomadura enzimática conduzida com uma combinação de uma enzima de fosfolipase C com uma enzima de fosfolipase

15 A fornece um produto de óleo desengomado com um teor de fósforo mais baixo em um tempo de reação mais curto do que seria obtido com a fosfolipase A sozinha. Além disso, foi surpreendentemente descoberto que a reação pode se processar em menos do que cerca de uma hora e pode se processar tão rapidamente quanto cerca de trinta minutos. Isto é

20 particularmente inesperado porque a PLA quando usada sozinha no geral requer um tempo de reação de pelo menos cerca de 4 horas, enquanto que a PLC quando usada sozinha no geral requer um tempo de reação de cerca de uma hora. Além disso, a PLA tem um pH de reação ótimo de 4,5, enquanto que a PLC tem um pH de reação ótimo de 7,0. Cada enzima também tem

25 tolerâncias térmicas diferentes. A enzima PLA desnaturará a cerca de 50°C enquanto que a enzima PLC desnaturará a cerca de 65°C. Além disso, é conhecido na técnica que a estabilidade térmica de enzimas pode ser melhorada por intermédio de mutações específicas. Tais enzimas clonadas podem ser termicamente estáveis em temperaturas tão altas quanto 80°C e o

uso de tais enzimas clonadas é considerado na presente invenção.

A redução do tempo de reação é evidenciado pela PLA. Quando usada em combinação com PLC, o tempo de reação é dramaticamente reduzido e em algumas formas de realização pode ser menor

5 do que cerca de 1 hora, mesmo sob condições de reação ácidas que não são ótimas para a PLC. Os inventores descobriram ainda que sob condições apropriadas é possível reduzir o tempo de reação para tão baixo quanto cerca de 30 minutos.

Verificou-se que a concentração de água pode ser ajustada

10 para atingir as necessidades de um ambiente de processamento particular. Assim, a concentração de água pode ser diminuída a cerca de 1 a 2 % e particularmente a cerca de 1,5 %, onde é desejado reduzir a quantidade de água reduzida produzida pelo processo. Alternativamente, a concentração de água pode ser aumentada para cerca de 4 a 5 % e particularmente para cerca

15 de 4,5 %, onde é desejado aumentar a eficiência do processo para desengomadura.

É uma vantagem da presente invenção que o óleo a ser desengomado possa ser óleo bruto ou previamente desengomado por um dos métodos da técnica anterior. É uma vantagem distinta para o processador de

20 óleo ser capaz de realizar a desengomadura de óleo em uma única etapa. Os óleos que podem ser tratados de acordo com a presente invenção podem incluir mas não são limitados aos seguintes: óleo de canola, óleo de mamona, óleo de coco, óleo de coentro, óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de avelã, óleo de semente de cânhamo, óleo de linhaça, óleo de semente

25 de manga, óleo de Limnanthes, óleo de pé de boi, óleo de oliva, óleo de palma, óleo de dendê, oleína de palma, óleo de amendoim, óleo de colza, óleo de farelo de arroz, óleo de cártamo, óleo de camélia, óleo de soja, óleo de semente de girassol, talóleo, óleo tsubaki e óleo vegetal.

A enzima de fosfolipase A usada no método da presente

invenção pode ser uma enzima de fosfolipase A1 ou uma enzima de fosfolipase A2. A enzima de fosfolipase C usada na presente invenção pode ser uma fosfolipase C ou uma fosfolipase C específica de inositol. Muitas variedades de enzimas nas famílias da fosfolipase A e fosfolipase C são 5 comercialmente disponíveis; e é considerado que tais enzimas e seus equivalentes serão adequados para o uso na presente invenção.

No método da invenção, as fosfolipases diferentes usadas juntas em um processo para desengomadura enzimática da presente invenção podem ser misturadas entre si antes de serem adicionadas ao óleo a ser 10 tratado. Alternativamente, elas podem ser adicionadas ao óleo separadamente, sequencial ou simultaneamente. Se adicionadas sequencial ou simultaneamente, a reação enzimática processar-se-á no mesmo ponto com ambas as enzimas presentes na mistura de reação.

O processo para desengomadura da presente invenção é 15 realizada em um pH abaixo de cerca de 8, preferível entre cerca de 3 a 7 e o mais preferivelmente entre cerca de 4 e 5. O pH do processo para desengomadura enzimática pode ser obtido pela adição de tampões conhecidos. Ácido cítrico e hidróxido de sódio são bem conhecidos como sendo adequados para este propósito. Outros agentes de tamponização podem 20 ser usados como necessário para ajustar o pH sob condições de reação específicas.

A temperatura do processo para desengomadura enzimática da presente invenção pode estar na faixa de cerca de 40 a 80°C, preferivelmente na faixa de cerca de 40 a 60°C e mais preferivelmente na faixa de cerca de 45 25 a 55°C. Verificou-se que, surpreendentemente, sob os métodos da presente invenção a desengomadura com PLA pode se processar a uma temperatura acima do seu próprio ótimo de 45°C e mais próximo à da temperatura de operação ótima da PLC, sem desnaturação excessiva.

O método da presente invenção fornece um processo para

desengomadura de etapa única em que o teor de fosfolipídeos de um óleo, mesmo um óleo bruto, pode ser reduzido a menos do que 50 ppm de P, preferivelmente menos do que 20 ppm de P, mais preferivelmente menos do que 10 ppm de P e o mais preferivelmente menos do que 5 ppm de P.

5 Depois que a desengomadura enzimática foi completada e o óleo desengomado foi separado das gomas, o óleo desengomado pode ser submetido a outras etapas de processamento conhecidas na técnica tais como branqueamento ou desodorização, como pode ser necessário ou desejável dependendo do uso final para o qual o produto de óleo desengomado é
10 intencionado.

Várias formas de realização preferidas da invenção são apresentadas no exemplos abaixo, junto com exemplos de controle usando as condições da técnica anterior. Em cada um dos exemplos abaixo, o misturador suspenso foi um misturador Heidolph modelo Elector KG com uma pá de
15 lâmina chata; operado a 90 rpm para a agitação normal e 350 rpm para a agitação vigorosa. A centrífuga foi uma De Laval Gyro - Tester instalada com “A Unidade de Tigela” para a separação contínua. A tigela da centrífuga foi fechada com os parafusos de tampão instalados. A mistura de cisalhamento foi realizada com um homogeneizador Ultra-Turrax SD-45 com um rotor estator G450 a 10.000 rpm. A enzima PLA1 foi Lecitase® Ultra (número de
20 lote LYN050070) vendida pela Novozymes A/S of Denmark e tendo uma concentração de 11,2 Unidades/mg. A enzima PLA2 foi Rohalase® MPL (Número de lote Ch: 4738) vendida pela AB Enzymes localizada na Alemanha e tendo uma concentração de 2000 Unidades/mg. A enzima PLC
25 foi Purifine® vendida pela Diversa Corporation of San Diego, Califórnia. Para os exemplos de 1 a 12, a PLC foi do Lote BD16449, tendo uma concentração de 205 Unidades/mg. Para os exemplos de 13 a 38, a PLC foi do Lote 90BU002A1, tendo uma concentração de 27,5 Unidades/mg. A quantidade de fosfolipídeos que permanece no óleo tratado foi medida como ppm de P de

acordo com o método da American Oil Chemists' Society Official Method Ca 20-99, "Analysis of Phosphorus in Oil by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy."

Exemplo 1

5 Controle: Desengomadura em água - 1965,4 gramas de óleo de soja bruto contendo 746 ppm de fósforo foram aquecidos de 70 a 75°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. Ao óleo quente, 39,4 gramas de água deionizada foram adicionados com agitação vigorosa por 1 minuto. O misturador foi diminuído para a velocidade normal (90 rpm) para 10 permitir que as gomas floculassesem por 30 minutos. O óleo foi depois centrifugado e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado em água foi de 80,7 ppm.

Exemplo 2

Controle: A desengomadura enzimática única com Fosfolipase 15 A1 (PLA1) - 1997,9 g de óleo de soja bruto contendo 746 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e a mistura foi cisalhada por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por uma hora com um misturador suspenso. O óleo foi 20 deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo estivesse de 40 a 45°C, depois 1.8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida de 40 a 45°C, primeiro 60,0 25 gramas de água deionizada foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento 1 minuto, depois 0,1044 grama de PLA1 Lecitase® Ultra da Novozymes foi adicionado e a mistura inteira foi cisalhada por 1 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal com um misturador suspenso por 4 horas em uma faixa de temperatura de 41 a 48°C. O óleo tratado

com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado com PLA1 foi de 31,7 ppm.

Exemplo 3

5 Controle: Desengomadura enzimática única com Fosfolipase C (PLC) - 2011,1 gramas de óleo de soja bruto contendo 746 ppm de fósforo foram aquecidos de 55 a 60°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 60,3 gramas de água deionizada foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento por 1 minuto. 0,1051 grama de Purifine® da 10 Diversa (PLC lipase 13D16449 contendo 205 U/g) foi adicionado e a mistura foi cisalhada por 1 minuto. A mistura de óleo passou pela agitação normal por 1 hora de 50 a 63°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado com PLC foi de 70,9 ppm.

15 Exemplo 4

Controle: Desengomadura com PLC seguida pela PLA - neste exemplo de controle, a mostra de óleo é reagida com cada enzima separadamente sob as condições de reação ótimas para esta enzima, de acordo com a técnica anterior. 2110,5 gramas de óleo de soja bruto contendo 560,1 ppm de fósforo foram aquecidos a 60°C sob agitação normal. 63 gramas de água deionizada e 0,1123 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase BD16449 contendo 205 U/mg) foram adicionados e a mistura cisalhada por 1 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 1 hora de 55 a 56°C. O óleo foi depois centrifugado e o óleo e as gomas úmidas foram 20 coletados. Para criar um tampão de pH 4,5, primeiro 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados ao óleo desengomado com PLC, a mistura foi cisalhada por 1 minuto e depois agitada por uma hora na velocidade normal com um misturador suspenso; depois 1,8 mililitro de 25 solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura de óleo foi

misturada com cisalhamento por 10 segundos. 59 gramas de água deionizada foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento 1 minuto. Com o tampão estabelecido, 0,1061 grama de PLA1 Lecitase® Ultra da Novozymes foi adicionado e a mistura inteira foi cisalhada por 1 minuto. O óleo foi agitado na velocidade normal por 4 horas em uma faixa de temperatura de aproximadamente 45°C. O óleo foi depois centrifugado; o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado sequencialmente pela PLC depois PLA1 foi de 3,2 ppm.

Exemplo 5

PLC e PLA1 juntas, pH neutro com um tempo de reação de 1 hora a 4,5°C - 2004,9 gramas de óleo de soja bruto contendo 560,1 ppm de fósforo foram aquecidos a 45°C sob agitação normal. Com o óleo em um pH neutro, 60 gramas de água deionizada, 0,1037 grama de Purfine® da Diversa (enzima PLC) e 0,1076 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (enzima PLA1) foram adicionados ao óleo e a mistura inteira foi cisalhada por 1 minuto. A mistura de óleo e enzima foi agitada na velocidade normal por 1 hora em uma temperatura de aproximadamente 45°C. O óleo foi depois centrifugado e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O óleo tratado com a mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH neutro e 45°C com uma hora de tempo de reação produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 13,2 ppm.

Este valor de fósforo residual é显著mente mais baixo do que aquele obtido com PLA sozinha sob suas condições ótimas (Exemplo 2) ou PLC sozinha sob suas condições ótimas (Exemplo 3).

Exemplo 6

PLC e PLA1 juntas, pH neutro com um tempo de reação de 4 horas a 45°C - 2003,7 gramas de óleo de soja bruto contendo 560,1 ppm de fósforo foram aquecidos a 45°C sob agitação normal. 60 gramas de água deionizada, 0,1040 grama de Purfine® da Diversa (enzima PLC) e 0,1085

grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (enzima PLA1) foram adicionados e a mistura inteira foi cisalhada por 1 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 4 horas em uma temperatura de aproximadamente 45°C. O óleo foi depois centrifugado e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O processo usando a mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas com quatro horas de tempo de reação em um pH neutro produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 10,5 ppm.

Este valor de fósforo residual é apenas uma leve melhora em relação àquela obtida no Exemplo 5. indicando que um aumento do tempo de reação de uma hora para quatro horas não fez uma diferença significante na eficácia do processo para desengomadura.

Exemplo 7

PLC e PLA1 juntas, pH 4,5 com um tempo de reação de 1 hora a 45°C - 2021,4 g de óleo de soja bruto contendo 547,9 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por uma hora. O óleo foi deixado esfriar até que a temperatura atingisse de 40 a 45°C, depois 1,8 mililitros de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. 61,0 gramas de água deionizada, 0,1184 grama de Purfine® da Diversa (enzima PLC) e 0,1038 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (enzima PLA1) foram adicionados e a mistura inteira foi cisalhada por 1 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 1 hora em uma temperatura de aproximadamente 45°C. O óleo foi depois centrifugado e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O processo usando a mistura de enzimas PLC e PLA combinada com uma hora de tempo de reação em um pH de 4,5 e uma temperatura de 45°C produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 2,4 ppm.

Este valor de fósforo residual está em torno do mesmo e mesmo levemente melhor, do que aquele obtido no Exemplo 4 em que cada enzima foi reagida separadamente e nas suas próprias condições ótimas. Surpreendentemente, a eficácia da desengomadura é apenas tão boa quanto 5 quando as duas enzimas são conduzidas juntas em um tempo de reação não ótimo para PLA e em um pH e temperatura não ótimos para PLC, como para as duas enzimas conduzidas separadamente, cada uma nas suas próprias condições ótimas.

Exemplo 8

10 PLC e PLA1 juntas, pH 4,5 com um tempo de reação de 4 horas a 45°C - 2069,3 g de óleo de soja bruto contendo 547,9 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e a mistura foi cisalhada por 1 minuto e depois agitada na velocidade normal por uma hora. A mistura foi 15 deixada esfriar de 40 a 45°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. 63 gramas de água deionizada, 0,1112 grama de Purfine® da Diversa (enzima PLC) e 0,1258 gramas de Lecitase® Ultra da Novozymes (enzima PLA1) foram adicionados e a mistura inteira foi cisalhada por 1 20 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 4 horas em uma temperatura de aproximadamente 45°C. A mistura oleosa foi depois centrifugada e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletadas. O processo usando a mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas com quatro 25 horas de tempo de reação em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 2,5 ppm.

Este valor de fósforo residual está em torno do mesmo como aquele obtido no Exemplo 7 indicando que um aumento do tempo de reação de uma hora para quatro horas não fez uma diferença significante na eficácia do processo para desengomadura.

Exemplo 9

PLC e PLA1 juntas, pH 4,5 com um tempo de reação de 1 hora a 55°C - 1985,2 g de óleo de soja bruto contendo 547,9 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e a mistura foi cisalhada por 1 minuto, depois agitada em uma velocidade normal por uma hora. A mistura foi deixada esfriar de 40 a 45°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. 63,0 gramas de água deionizada, 0,1085 grama de Purfine® da Diversa (enzima PLC) e 0,1045 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (enzima PLA1) foram adicionados e a mistura inteira foi cisalhada por 1 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 1 hora em uma temperatura de 55°C. O óleo foi depois centrifugado; o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O processo usando a mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas com uma hora de tempo de reação em um pH de 4,5 e uma temperatura de reação de 55°C produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 2,3 ppm.

Este valor de fósforo residual está em torno do mesmo como aquele obtido nos Exemplos 7 e 8, indicando que um aumento da temperatura de reação de cerca de 45°C a cerca de 55°C não fez uma diferença significante na eficácia do processo para desengomadura, mesmo considerando que PLA1 normalmente seria esperada desnaturar em uma temperatura acima de 50°C.

Exemplo 10

PLC e 2 vezes a concentração de PLA juntas, pH 4,5 com um tempo de reação de 1 hora a 45°C - 1992,2 g de óleo de soja bruto contendo 547,9 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação na velocidade normal. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e a mistura foi cisalhada por 1 minuto, depois agitada por uma

hora. A mistura foi deixada esfriar de 40 a 45°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. À mistura foram adicionados 60 gramas de água deionizada, 0,1319 grama de Purfine® da Diversa (enzima PLC) e 0,2139 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (enzima PLA1) e a mistura inteira foi cisalhada por 1 minuto. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 1 hora em uma faixa de temperatura de 45°C. A mistura oleosa foi depois centrifugada; o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O processo usando a mistura enzimática de PLC e duas vezes a concentração de PLA1 combinadas com uma hora de tempo de reação em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 7,0 ppm.

Este valor de fósforo residual é aceitável para certas aplicações mas não exatamente tão bom quanto aqueles obtido nos Exemplos 7 a 9, indicando que, surpreendentemente, aumentar a dosagem de PLA1 não resulta em eficácia melhorada do processo para desengomadura, mesmo sob condições de reação ótimas para PLA1.

Exemplo 11

PLC e PLA2 juntas, pH 4,5 com tempo de retenção de 1 hora a 20 45°C - 1998,4 gramas de óleo de soja bruto contendo 341,2 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida de 40 a 45°C, 0,1112 gramas de Puriline® da Diversa ((PLC lipase

BD16449 contendo 205 U/mg) e 0,2094 grama Rohalase® MPL (Número de lote Ch: 4738) vendidas pela AB Enzymes foram adicionados seguido por 60 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 5 minutos em uma temperatura de 40 a 45°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzima PLC e PLA2 combinadas no pH neutro produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 3,3 ppm.

Este exemplo é similar ao Exemplo 7 acima, mas para a 10 substituição de PLA2 no lugar de PLA1. O nível de fósforo residual baixo no produto acabado demonstra que PLA2 pode funcionar quase igualmente bem como PLA1 no método da presente invenção.

Exemplo 12

PLC e PLA2 juntas, pH 4,5 com tempo de retenção de 4 horas 15 a 45°C - 1998,4 gramas de óleo de soja bruto contendo 341,2 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com 20 agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo foi de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida de 40 a 45°C, 0,1038 grama de Purifine® da Diversa ((PLC lipase 25 BD16449 contendo 205 U/mg) e 0,2047 grama de Rohalase® MPL (Número de lote Ch: 4738) vendida pela AB Enzymes foram adicionados seguidos por 60 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 4 horas em uma temperatura de 40 a 45°C. O óleo tratado com

enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na Mistura de enzima combinada PLC e PLA2 no pH neutro produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 5,8 ppm.

Este exemplo ilustra que aumentar o tempo de reação de uma para quatro horas não resultou em melhor desengomadura e de fato resultou em um nível mais alto de fósforo residual.

Os resultados dos Exemplos de 1 a 12 precedentes estão resumidos na Tabela 2 abaixo.

10

Tabela 2

| Ex. | Adição de Enzima | PLC (ppm de Enzima ativa) | PLA1 (ppm de Enzima ativa) | PLA2 (ppm de Enzima ativa) | Tempo de Reação (min.) | Temp. (C) | pH | Água (%) | Fos. (ppm) |
|-----|------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|-----------|-----|----------|------------|
| 1 | Nenhuma | | | | 30 | 70-75 | 7 | 2,0 | 80,7 |
| 2 | Única | | 0,6 | | 240 | 41-48 | 4,5 | 3,0 | 31,7 |
| 3 | Única | 10,8 | | | 60 | 50-63 | 7 | 3,0 | 70,9 |
| 4 | Sequencial | 11,5 | 0,6 | | 60, 240 | 55, 45 | 4,5 | 3,1 | 3,2 |
| 5 | Simultânea | 10,6 | 0,6 | | 60 | 45 | 7 | 3,0 | 13,2 |
| 6 | Simultânea | 10,7 | 0,6 | | 240 | 45 | 7 | 3,0 | 10,5 |
| 7 | Simultânea | 12,1 | 0,6 | | 60 | 45 | 4,5 | 3,0 | 2,4 |
| 8 | Simultânea | 11,4 | 0,7 | | 240 | 45 | 4,5 | 3,1 | 2,5 |
| | Simultânea | 11,1 | 0,6 | | 60 | 55 | 4,5 | 3,1 | 2,3 |
| 10 | Simultânea | 13,5 | 1,2 | | 60 | 45 | 4,5 | 3,0 | 7,0 |
| 11 | Simultânea | 11,4 | | 209 | 60 | 45 | 4,5 | 3,0 | 3,3 |
| 1,2 | Simultânea | 10,6 | | 205 | 240 | 45 | 4,5 | 3,0 | 5,8 |

Exemplos 13 a 30

Um Planejamento de Experimentos (DOE) foi ajustado para determinar os efeitos de certas variáveis de controle do processo para o processo para desengomadura enzimática, como apresentado na Tabela 3 abaixo.

15

Tabela 3

| Variável | Níveis | | |
|----------------------------------|------------|------------|-----|
| Adição de Enzima | Sequencial | Simultânea | |
| Quantidade de PLC (ppm de ativo) | 10 | 20 | 30 |
| Quantidade de PLA (ppm de ativo) | 0,5 | 1,0 | 2,0 |
| Tempo de agitação (s) | 45 | 60 | 120 |
| pH | 4,5 | 5,0 | 7,0 |
| Água (%) | 1,5 | 3,0 | 4,5 |
| Temperatura (°C) | 40 | 50 | 60 |
| Tempo de reação (min) | 30 | 60 | 120 |

Sequencial - cada enzima foi adicionada separadamente, embora ambas as enzimas estivessem em contato com a mistura de óleo durante pelo menos parte do tempo de reação

5 Simultâneo - Ambas as enzimas foram adicionadas ao mesmo tempo

pH - O pH no qual as enzimas são expostas ao óleo

10 Temperatura - Temperatura na qual as enzimas são expostas ao óleo

15 Tempo de agitação - O tempo que a mistura é agitada em velocidade alta depois da adição de cada enzima

Tempo de reação - Tempo Total que pelo menos uma enzima está em contato com o óleo

Estas variáveis operacionais onde avaliadas em dezoito testes separados, aqui apresentados como Exemplos 13 a 30. Os valores de cada variável testada em cada exemplo 13 a 30 são apresentados na Tabela 4 abaixo.

Tabela 4

| Ex. | Adição de Enzima | PLC (ppm de enzima ativa) | PLA1 (ppm de enzima ativa) | Tempo de Reação (minutos) | Temp. (C) | pH | Água (%) | Tempo de Agitação (segundos) |
|-----|------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------|-----|----------|------------------------------|
| 12 | Sequencial | 20 | 1 | 120 | 40 | 5 | 1,5 | 120 |
| 14 | Simultâneo | 20 | 1 | 60 | 60 | 7 | 1,5 | 45 |
| 15 | Sequencial | 10 | 1 | 30 | 40 | 7 | 4,5 | 60 |
| 16 | Sequencial | 10 | 2 | 60 | 50 | 4,5 | 1,5 | 120 |
| 17 | Sequencial | 20 | 2 | 30 | 50 | 7 | 3,0 | 45 |
| 18 | Sequencial | 10 | 0,5 | 120 | 60 | 5 | 3,0 | 45 |
| 19 | Simultâneo | 30 | 2 | 30 | 60 | 5 | 1,5 | 60 |
| 20 | Simultâneo | 10 | 2 | 120 | 60 | 7 | 4,5 | 120 |
| 21 | Simultâneo | 20 | 2 | 120 | 40 | 4,5 | 3,0 | 60 |
| 22 | Sequencial | 30 | 2 | 60 | 40 | 5 | 4,5 | 45 |
| 23 | Sequencial | 30 | 1 | 30 | 60 | 4,5 | 3,0 | 120 |
| 24 | Simultâneo | 30 | 1 | 120 | 50 | 4,5 | 4,5 | 45 |
| 25 | Simultâneo | 10 | 1 | 60 | 50 | 5 | 3,0 | 60 |
| 26 | Sequencial | 20 | 0,5 | 60 | 60 | 4,5 | 4,5 | 60 |
| 27 | Sequencial | 30 | 0,5 | 120 | 50 | 7 | 1,5 | 60 |
| 28 | Simultâneo | 30 | 0,5 | 60 | 40 | 7 | 3,0 | 120 |
| 29 | Simultâneo | 20 | 0,5 | 30 | 50 | 5 | 4,5 | 1,20 |
| 30 | Simultâneo | 10 | 0,5 | 30 | 40 | 4,5 | 1,5 | 45 |

Exemplo 13

1999,1 gramas de óleo de soja bruto contendo 769,5 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 2,4 mililitros de solução 4 molar de hidróxido de sódio foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 5,0. Com a temperatura mantida a 40°C, 1,5008 grama de Purifine® Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foi adicionado seguido por 30 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 minutos.

Com a temperatura mantida a 40°C, 0,2132 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura de óleo foi agitada na velocidade normal por 60 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual n óleo desengomado com PLC depois PLA1 sequencial foi de 6,5 ppm.

Exemplo 14

2010,5 gramas de óleo de soja bruto contendo 785,1 ppm de fósforo foram esfriados a 60°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. Com a temperatura mantida a 60°C, 1,5316 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,2073 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foram adicionados seguido por 30 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi

agitada na velocidade normal por 60 minutos em uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletadas. O fósforo residual na mistura de enzima PLC e PLA1 combinadas em pH neutro produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 109,6 ppm.

5 Exemplo 15

1994,5 gramas de óleo de soja bruto contendo 785,1 ppm de fósforo foi esfriado a 40°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. Com a temperatura mantida a 40°C, 0,754 grama de Purifine® da 10 Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foi adicionado seguido por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 15 minutos. Com a temperatura mantida a 40°C, 0,2242 grama de 15 Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 15 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O 20 fósforo residual no óleo desengomado com PLC depois PLA1 sequencial foi de 27,4 ppm.

Exemplo 16

2002,0 gramas de óleo de soja bruto contendo 785,1 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram 25 adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse 50°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e

o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 50°C, 0,7498 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foi adicionado seguido por 30 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos. Com a temperatura mantida em 50°C, 0,4064 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 50°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado por PLC depois PLA1 sequencial foi de 7,6 ppm.

Exemplo 17

2010,7 gramas de óleo de soja bruto contendo 785,1 ppm de fósforo foram aquecidos a 50°C sob agitação normal utilizando e misturador suspenso. Com a temperatura mantida em 50°C, 1,4981 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foi adicionado seguido por 60 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 15 minutos. Com a temperatura mantida em 50°C, 0,4143 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 15 minutos em uma temperatura de 50°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado por PLC depois PLA1 sequencial foi de 79,3 ppm.

Exemplo 18

2005,3 gramas de óleo de soja bruto contendo 742,9 ppm de

fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 60°C, depois 2,4 mililitros de solução 4 molar de hidróxido de sódio foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 5,0. Com a temperatura mantida em 60°C, 0,7491 grama de Purifine® da Diversa (PLC 10 lipase número de lote 90BU002A1) foi adicionado seguido por 60 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 minutos. Com a temperatura mantida em 60°C, 0,1220 grama de Lecitasek Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 minutos em uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado por PLC depois PLA1 sequencial foi de 2,2 ppm.

20

Exemplo 19

2000,4 gramas de óleo de soja bruto contendo 742,9 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 60°C, depois 2,4 mililitros de solução 4 molar de hidróxido de sódio foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 5,0. Com

a temperatura mantida em 60°C, 2,2270 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002 Al) e 0,3937 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foram adicionados seguidos por 30 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada 5 com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas no pH 5,0 produziu um óleo desengomado com um fósforo 10 residual de 7,8 ppm.

Exemplo 20

2006,3 gramas de óleo de soja bruto contendo 719,3 ppm de fósforo foram aquecidos a 60°C sob agitação normal utilizando e misturador suspenso. Com a temperatura mantida em 60°C, 0,7561 grama de Purifine® 15 da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,4098 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foram adicionados seguidos por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 120 minutos em uma temperatura de 20 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em pH neutro produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 64,1 ppm.

Exemplo 21

25 1998,5 gramas de óleo de soja bruto contendo 719,3 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados for 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com

agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida a 40°C, 1,4798 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foi adicionado e 0,4018 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYNO5007) foi adicionado seguido por 60 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 120 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzima PLC e PLA1 combinadas no pH 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 5,5 ppm.

15

Exemplo 22

2001,3 gramas de óleo de soja bruto contendo 719,3 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 2,4 mililitros de solução 4 molar de hidróxido de sódio foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 5,0. Com a temperatura mantida em 40°C, 2,2580 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foram adicionados seguidos por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos. Com a temperatura mantida em 40°C, 0,4126 grama de Lecitase®

Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletadas. O fósforo residual no óleo desengomado tratado com PLC e PLA1 sequencial teve um fósforo residual de 2,1 ppm.

Exemplo 23

2002,0 gramas de óleo de soja bruto contendo 747,3 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse 60°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 60°C, 2,2194 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) seguido por 60 gramas de água deionizada foram adicionados e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 15 minutos. Com a temperatura mantida em 60°C, 0,2198 gramas de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 15 minutos em uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado tratado com PLC e PLA1 sequencial teve um fósforo residual de 4,6 ppm.

Exemplo 24

2000,8 gramas de óleo de soja bruto contendo 747,3 ppm de fósforo foram aquecidos de 75°C a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 50°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 50°C, 2,2500 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foram adicionados e 0,2216 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 120 minutos em uma temperatura de 50°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 1,8 ppm.

Exemplo 25

1998,9 gramas de óleo de soja bruto contendo 747,3 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse 50°C, depois 2,4 mililitros de solução 4 molar de hidróxido de sódio foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O

ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 5,0. Com a temperatura mantida em 50°C, 0,7445 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) foi adicionado e 0,2042 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase lote número LYN05007) foi adicionado seguido por 60 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 minutos em uma temperatura de 50°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 7,2 ppm.

Exemplo 26

1997,3 gramas de óleo de soja bruto contendo 810,8 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 60°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 60°C, 1,5189 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) seguido por 90 gramas de água deionizada foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos. Com a temperatura mantida em 60°C, 0,1119 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura

de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado tratado com PLC e PLA1 sequencial teve um fósforo residual de 2,2 ppm.

5

Exemplo 27

2010,0 gramas de óleo de soja bruto contendo 810,8 ppm de fósforo foi esfriado a 50°C sob agitação normal utilizando e misturador suspenso. Com a temperatura mantida em 50°C, 2,2608 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) seguidos por 30 gramas de água deionizada foram adicionados e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 minutos. Com a temperatura mantida em 50°C, 0,1172 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 60 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 minutos em uma temperatura de 50°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual no óleo desengomado tratado com PLC e PLA1 sequencial em um pH neutro teve um fósforo residual de 72,6 ppm.

10

Exemplo 28

2005,1 gramas de óleo de soja bruto contendo 810,8 ppm de fósforo foram aquecidos a 40°C sob agitação normal utilizando e misturador suspenso. Com a temperatura mantida em 40°C, 2,2622 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1031 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 60 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 60 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas

15

20

úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH neutro produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 61,5 ppm.

Exemplo 29

5 2006,3 gramas de óleo de soja bruto contendo 795,3 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com 10 agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 50°C, depois 2,4 mililitros de solução 4 molar de hidróxido de sódio foram adicionados e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 5,0. Com 15 a temperatura mantida em 50°C, 1,5373 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1168 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 50°C. O óleo tratado com 20 enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzima PLC e PLA1 combinadas em um pH de 5,0 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 1,9 ppm.

Exemplo 30

25 2006,1 gramas de óleo de soja bruto contendo 795,3 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com

agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 40°C, 0,7736 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1072 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 30 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 13,7 ppm.

Os resultados dos Exemplos de 13 a 30 em termos do nível de fósforo obtido são apresentados na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5

| Ex. | Adição de Enzima | PLC (ppm de Enzima Ativa) | PLA1 (ppm de Enzima Ativa) | Tempo de Reação {minutos} | Temp (°C) | pH | Água (%) | Tempo de Agitação (segundos) | Fos (ppm) |
|-----|------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------|-----|----------|------------------------------|-----------|
| 13 | Sequencial | 20,6 | 1,2 | 120 | 40 | 5 | 1,5 | 120 | 6,5 |
| 14 | Simultâneo | 21,1 | 1,2 | 60 | 60 | 7 | 1,5 | 45 | 109,6 |
| 15 | Sequencial | 10,4 | 1,3 | 30 | 40 | 7 | 4,5 | 60 | 27,4 |
| 16 | Sequencial | 10,3 | 2,3 | 60 | 50 | 4,5 | 1,5 | 120 | 7,6 |
| 17 | Sequencial | 20,6 | 2,3 | 30 | 50 | 7 | 3,0 | 45 | 79,3 |
| 18 | Sequencial | 10,3 | 0,7 | 120 | 60 | 5 | 3,0 | 45 | 2,2 |
| 19 | Simultâneo | 30,6 | 2,2 | 30 | 60 | 5 | 1,5 | 60 | 7,8 |
| 20 | Simultâneo | 10,4 | 2,3 | 120 | 60 | 7 | 4,5 | 120 | 64,1 |
| 21 | Simultâneo | 20,3 | 2,3 | 120 | 40 | 4,5 | 3,0 | 60 | 5,5 |
| 22 | Sequencial | 31,0 | 2,3 | 60 | 40 | 5 | 4,5 | 45 | 2,1 |
| 23 | Sequencial | 30,5 | 1,2 | 30 | 60 | 4,5 | 3,0 | 120 | 4,6 |
| 24 | Simultâneo | 30,9 | 1,2 | 120 | 50 | 4,5 | 4,5 | 45 | 1,8 |
| 25 | Simultâneo | 10,2 | 1,4 | 60 | 50 | 5 | 3,0 | 60 | 7,2 |
| 26 | Sequencial | 20,9 | 0,6 | 60 | 60 | 4,5 | 4,5 | 60 | 2,2 |
| 27 | Sequencial | 31,1 | 0,7 | 120 | 50 | 7 | 1,5 | 60 | 72,6 |
| 28 | Simultâneo | 31,1 | 0,6 | 60 | 40 | 7 | 3,0 | 120 | 61,5 |
| 29 | Simultâneo | 21,1 | 0,7 | 30 | 50 | 5 | 4,5 | 120 | 1,9 |
| 30 | Simultâneo | 10,6 | 0,6 | 30 | 40 | 4,5 | 1,5 | 45 | 13,7 |

Um resumo das rodadas experimentais acima é ilustrado no gráfico mostrado na FIG. 6, que é uma plotagem da quantidade de fósforo final média em cada nível de cada fator.

Em um pH neutro, ótimo para a enzima PLC, a combinação 5 das duas enzimas falhou em produzir um óleo com valores de fósforo aceitáveis permitindo que o óleo fosse fisicamente refinado. Entretanto, em um pH ácido, ótimo para a enzima PLA, a combinação de enzimas adicionadas sequencialmente ou juntas produziu níveis de fósforo residual aceitáveis em óleos que permitiria que eles fossem fisicamente refinados. 10 Quando um pH ácido é utilizado, apenas uma das rodadas experimentais falharam em produzir um óleo com um fósforo residual de menos do que 10 ppm. O Exemplo 30 teve um nível de fósforo residual maior do que 10 (13,7 ppm) e foi produzido com os níveis mais baixos de ambas as enzimas, a temperatura mais baixa, a porcentagem mais baixa de água, os tempos de 15 mistura e de agitação mais curtos e o pH mais ácido.

Um efeito sinergístico foi descoberto entre a combinação de enzima permitindo que a reação fosse até a conclusão em menos do que 30 minutos, comparado com 1 hora para as enzimas PLC ou 4 horas para as enzimas PLA. Teste adicional foi completado para verificar o efeito do tempo 20 de reação muito curto; os resultados são apresentados na Tabela 6 abaixo. Nestes testes adicionais, o pH foi mantido em 4,5, em vista da descoberta acima de que um pH mais baixo produziu resultados significantemente mais favoráveis do que um pH neutro. A quantidade de PLA1 também foi mantida constante em 0,5 ppm, como foi determinado acima que aumentando a 25 quantidade de PLA1 acima este nível não resultou em desengomadura mais eficaz. Além disso, em cada um destes exemplos as enzimas foram adicionadas simultaneamente ao invés de sequencialmente, em vista da determinação acima esta adição simultânea de enzimas produziu resultados de desengomadura melhores do que a adição sequencial. Além disso, em um

processo industrial é vantajoso limitar o tempo de processo total, equipamento total e ativos dedicados.

Tabela 6

| Exemplo | Adição de Enzima | de PLC (ppm de Enzima Ativa) | PLA1 (ppm de Enzima Ativa) | Tempo de Reação (minutos) | Temp (C) | pH | Água (%) | Tempo de Agitação (segundos) |
|---------|------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------|------|----------|------------------------------|
| 31 | Simultâneo | 20 | 0,5 | 120 | 40 | 4,5 | 2,0 | 120 |
| 32 | Simultâneo | 10 | 0,5 | 120 | 60 | 14,5 | 4,5 | 45 |
| 33 | Simultâneo | 10 | 0,5 | 30 | 40 | 4,5 | 4,5 | 120 |
| 34 | Simultâneo | 20 | 0,5 | 30 | 60 | 4,5 | 2,0 | 45 |
| 35 | Simultâneo | 20 | 0,5 | 120 | 40 | 4,5 | 4,5 | 45 |
| 36 | Simultâneo | 20 | 0,5 | 30 | 60 | 4,5 | 4,5 | 120 |
| 37 | Simultâneo | 10 | 0,5 | 30 | 40 | 4,5 | 2,0 | 120 |
| 38 | Simultâneo | 10 | 0,5 | 120 | 60 | 4,5 | 2,0 | 120 |

Exemplo 31

5 2003,6 gramas de óleo de soja bruto contendo 784,8 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 40°C, 1,4603 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1021 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 40 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 120 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzima PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de

10,7 ppm.

Exemplo 32

2004,8 gramas de óleo de soja bruto contendo 784,8 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 60°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 60°C, 0,7509 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1105 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 120 minutos a uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 6,7 ppm.

Exemplo 33

2000,4 gramas de óleo de soja bruto contendo 697,7 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e

o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 40°C, 0,7530 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1022 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 90 5 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 10 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 2,2 ppm.

Exemplo 34

1999,4 gramas de óleo de soja bruto contendo 714,2 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 60°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e 15 o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 60°C, 1,508 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1139 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 40 20 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzima PLC e PLA1 combinada em um pH de 4,5 25 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 16,5 ppm.

Exemplo 35

1999 gramas de óleo de soja bruto contendo 714,2 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 40°C, 1,5010 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1060 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 120 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 1,9 ppm.

Exemplo 36

1999 gramas de óleo de soja bruto contendo 695,1 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse 60°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura

mantida em 60°C, 1,5296 gramas de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1241 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 90 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com 5 cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 10 5,2 ppm.

Exemplo 37

2005,2 gramas de óleo de soja bruto contendo 695,1 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e 15 o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 40°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e 20 o cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 40°C, 0,7422 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90IBU002A1) e 0,1195 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 40 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento 25 por 45 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 30 minutos em uma temperatura de 40°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 6,7 ppm.

Exemplo 38

1998 gramas de óleo de soja bruto contendo 695,1 ppm de fósforo foram aquecidos de 75 a 80°C sob agitação normal utilizando um misturador suspenso. 2,0 gramas de solução a 50 % p/p de ácido cítrico foram adicionados e cisalhados por 1 minuto. O óleo passou pela agitação normal por 1 hora com um misturador suspenso. O óleo foi deixado esfriar com agitação na velocidade normal até que a temperatura do óleo fosse de 60°C, depois 1,8 mililitro de solução 4 molar de hidróxido de sódio foi adicionado e a mistura foi misturada com cisalhamento por 10 segundos. O ácido cítrico e cáustico formaram um tampão fraco com um pH de 4,5. Com a temperatura mantida em 60°C, 0,7429 grama de Purifine® da Diversa (PLC lipase número de lote 90BU002A1) e 0,1041 grama de Lecitase® Ultra da Novozymes (PLA1 lipase número de lote LYN05007) foi adicionado seguido por 40 gramas de água deionizada e a mistura inteira foi misturada com cisalhamento por 120 segundos. A mistura oleosa foi agitada na velocidade normal por 120 minutos em uma temperatura de 60°C. O óleo tratado com enzima foi depois centrifugado; e o óleo separado e as gomas úmidas foram coletados. O fósforo residual na mistura de enzimas PLC e PLA1 combinadas em um pH de 4,5 produziu um óleo desengomado com um fósforo residual de 4,4 ppm.

Tabela 7

| Ex. | Adição de Enzima | de PLC (ppm de Enzima Ativa) | PLA1 (ppm de Enzima Ativa) | Tempo de Reação (minutos) | Temp (C) | pH | Água (%) | Tempo de Agitação (segundos) | Fosf (ppm) |
|-----|------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------|-----|----------|------------------------------|------------|
| 31 | Simultâneo | 20,9 | 0,7 | 120 | 40 | 4,5 | 2,0 | 120 | 10,7 |
| 32 | Simultâneo | 10,3 | 0,7 | 120 | 60 | 4,5 | 4,5 | 45 | 6,7 |
| 33 | Simultâneo | 10,4 | 0,7 | 30 | 40 | 4,5 | 4,5 | 120 | 2,2 |
| 34 | Simultâneo | 20,7 | 0,6 | 30 | 60 | 4,5 | 2,0 | 45 | 16,5 |
| 35 | Simultâneo | 20,7 | 0,6 | 120 | 40 | 4,5 | 4,5 | 45 | 1,9 |
| 36 | Simultâneo | 21,0 | 0,7 | 30 | 60 | 4,5 | 4,5 | 120 | 5,2 |
| 37 | Simultâneo | 10,2 | 0,6 | 30 | 40 | 4,5 | 2,0 | 45 | 6,7 |
| 38 | Simultâneo | 10,2 | 0,6 | 120 | 60 | 4,5 | 2,0 | 120 | 4,4 |

A FIG. 7 é um gráfico que resume os Exemplos de 31 a 38.

plotando a quantidade de fósforo final médio em cada nível de cada fator mantendo o pH, dosagem de PLA e adição combinada constante.

Os cinco fatores avaliados nestes Exemplos de 31 a 38 são listados abaixo em ordem de magnitude de seu efeito sobre o processo para desengomadura. Os efeitos são as diferenças no nível de fósforo médio (em valor absoluto) entre os ajustes de fator alto e baixo.

5 A dosagem de água aumentada diminui o fósforo residual

A dosagem de PLC diminuída diminui o fósforo residual

A temperatura de reação diminuída diminui o fósforo residual

10 A agitação aumentada diminui o fósforo residual

O tempo de reação aumentado diminui o fósforo residual

Foi divulgado um novo processo para desengomadura de óleos usando uma enzima de fosfolipase A e uma enzima de fosfolipase C simultaneamente. Verificou-se que, surpreendentemente, uma tal combinação funciona melhor do que cada enzima sozinha, mesmo quando por necessidade uma ou a outra das enzimas é reagida sob condições de reação que são menos do que ótimas para esta enzima. Também foi uma surpresa descobrir que a desengomadura em níveis de menos do que cerca de 10 ppm de fósforo, tão baixos quanto cerca de 5 ppm de fósforo e mesmo tão baixos quanto cerca de 20 3 ppm de fósforo no final produto seriam obtidos sob as condições apropriadas com tempos de reação tão baixos quanto cerca de trinta minutos. Além disso, sem desejar estar ligado pela teoria, parece que a enzima PLC ou um de seus produtos de reação da hidrólise está catalisando a reação da enzima PLA, permitindo que o tempo de reação seja显著mente menor 25 do que o tempo de reação para cada uma das enzimas isoladas. Estes resultados são inesperados com base nos parâmetros de reação ótima conhecidos para as enzimas PLA e PLC.

Aqueles habilitados na técnica reconhecerão a partir da divulgação precedente que vários parâmetros de operação podem ser variados

na prática da presente invenção, dependendo das metas de uma situação particular, enquanto ainda permanece dentro do escopo da invenção. Por exemplo, na determinação das concentrações das enzimas PLA e PLC a serem usadas em uma rodada particular, a escolha dependerá de se a meta é 5 conduzida no custo mais baixo possível ou no maior desempenho possível. Se a meta é conduzir no custo mais baixo possível, então a concentração de PLA pode ser menor do que cerca de 2,0 ppm, preferivelmente menor do que cerca de 1,0 ppm e o mais preferivelmente menor do que cerca de 0,5 ppm. Uma tal concentração baixa da enzima de PLA pode ainda fornecer desengomadura 10 eficaz em muitas situações. Ao contrário, se a maximização do desempenho é desejado, a concentração de PLA é preferivelmente pelo menos cerca de 0,5 ppm, mais preferivelmente pelo menos cerca de 1,0 ppm e o mais preferivelmente 2,0 ppm. Aqueles habilitados nas técnicas do processamento de óleo entenderão como variar as concentrações das enzimas na mistura de 15 reação para obter o equilíbrio desejado de eficiência de custo e desempenho de produto.

Variações em outras condições de processamento também são possíveis. O pH pode ser de cerca de 7,0, enquanto que o pH de cerca de 5,0 é preferível e o pH de cerca de 4,5 é presentemente preferido. A concentração 20 de água no sistema pode ser no geral de cerca de 3,0 %, mas pode ser tão baixo quanto cerca de 1,5 % se água residual reduzida é desejada ou tão altas quanto cerca de 4,5 % se maior eficiência de desengomadura é desejada. A temperatura de reação pode ser tão alta quanto cerca de 60°C, mas é mais preferivelmente menor do que cerca de 50°C e surpreendentemente o mais 25 preferível a cerca de 40°C. O tempo de agitação durante a mistura inicial pode ser de cerca de 45 segundos, é mais preferivelmente de cerca de 60 segundos e é o mais preferivelmente de cerca de 120 segundos. Finalmente, a duração da reação enzimática pode ser enormemente reduzida, em algumas formas de realização ser vantajosamente menor do que cerca de 60 minutos e

preferivelmente de cerca de 30 minutos.

Embora formas de realização preferidas da invenção tenham sido aqui apresentadas, outras formas de realização que abrangem o método inventivo estará facilmente evidente àqueles habilitados na técnica e todas de 5 tais formas de realização e seus equivalentes são intencionados a serem abrangidos por este pedido e abrangidos pelas reivindicações pertencentes a este.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para desengomar uma composição de óleo, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) fornecer uma composição de óleo contendo uma quantidade de fosfolipídeos,

(b) contactar a composição de óleo simultaneamente com uma ou mais enzimas de fosfolipase A em uma quantidade de 2 ppm de enzima ativa ou menos e uma ou mais enzimas de fosfolipase C em uma quantidade de 30 ppm de enzima ativa ou menos, e

(c) separar os produtos de reação de fosfolipídeo da composição de óleo, a composição de óleo remanescente depois da separação sendo uma composição de óleo desengomada,

em que a duração da reação das enzimas com os fosfolipídeos é menor do que 1 hora, a reação sendo conduzida em um pH de 3 a 7 a uma temperatura de 40 a 80°C, e a composição de óleo desengomada da etapa (c) tendo um conteúdo de fosfolipídeo medido com partes por milhão de fósforo de 20 ppm ou menos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a duração da reação das enzimas com os fosfolipídeos é de trinta minutos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma ou mais enzimas de fosfolipase A são selecionadas do grupo que consiste de uma enzima de fosfolipase A1 e uma enzima de fosfolipase A2.

4. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que uma ou mais enzimas de fosfolipase C são selecionadas do grupo que consiste de uma enzima de fosfolipase C e uma enzima de fosfolipase C específica de fosfatidil-inositol.

5. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação das enzimas com os fosfolipídeos ocorre em um pH de 4 a 5.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a reação das enzimas com os fosfolipídeos ocorre em uma temperatura de 40 a 60°C.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a reação das enzimas com os fosfolipídeos ocorre em uma temperatura de 45 a 55°C.

8. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição de óleo compreende um óleo bruto.

9. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição de óleo compreende um óleo previamente desengomado.

10. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a enzima PLC está presente em uma quantidade de 20 ppm de enzima ativa ou menos.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a enzima PLC está presente em uma quantidade de 10 ppm de enzima ativa ou menos.

12. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a enzima PLA está presente em uma quantidade de 1 ppm de enzima ativa ou menos.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que a enzima PLA está presente em uma quantidade de 0,5 ppm de enzima ativa ou menos.

14. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que durante a etapa (b) a mistura da composição de óleo e as enzimas são inicialmente misturadas com cisalhamento.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a mistura de cisalhamento continua por uma duração de pelo menos 45 segundos.

16. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que durante a etapa (b) uma quantidade de água é adicionada.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a quantidade de água é de pelo menos 1,5 % em peso da mistura total.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a quantidade de água é de pelo menos 3,0 % em peso da mistura total.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a quantidade de água é de pelo menos 4,5 % em peso da mistura total.

20. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o teor de fosfolipídeo é de 10 ppm ou menos.

21. Método, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o teor de fosfolipídeo é de 5 ppm ou menos.

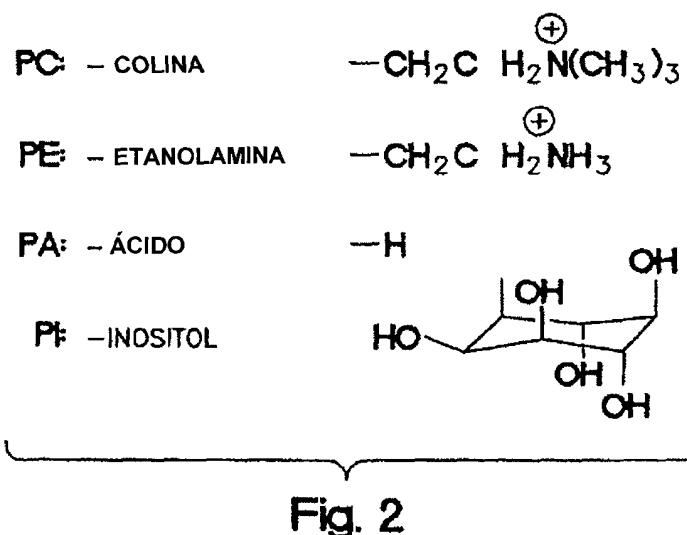
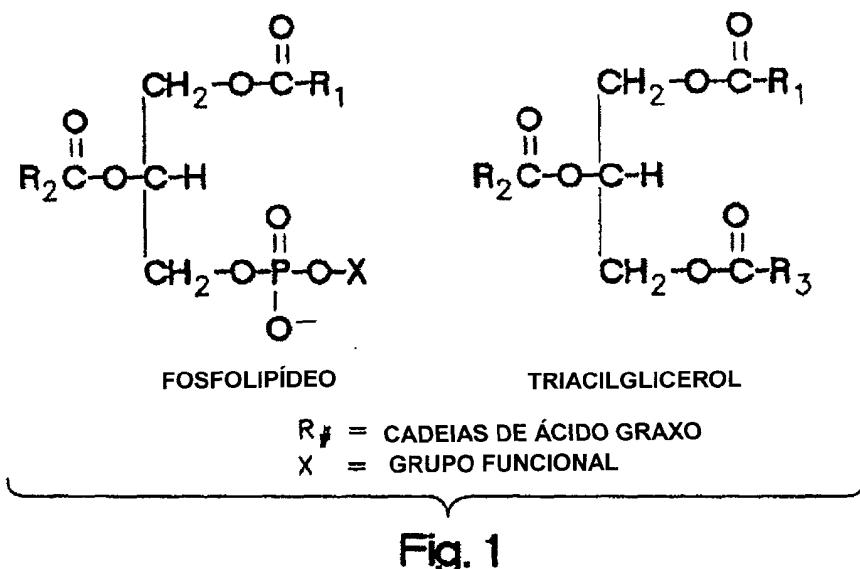


Fig. 2

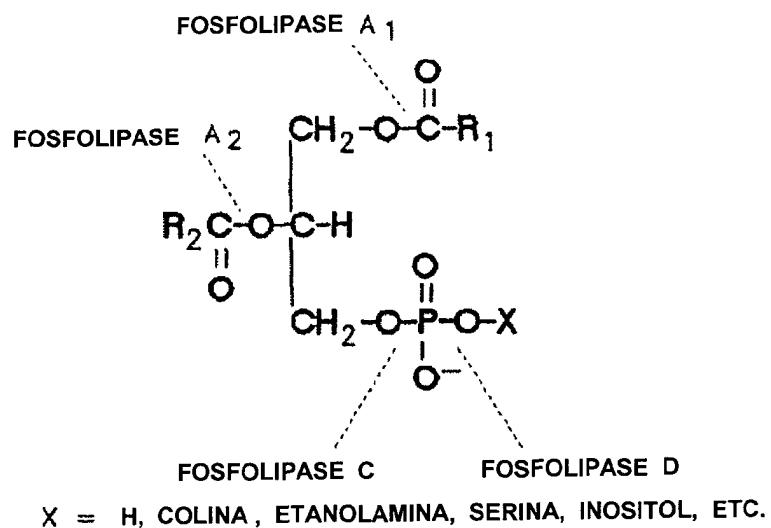


Fig. 3

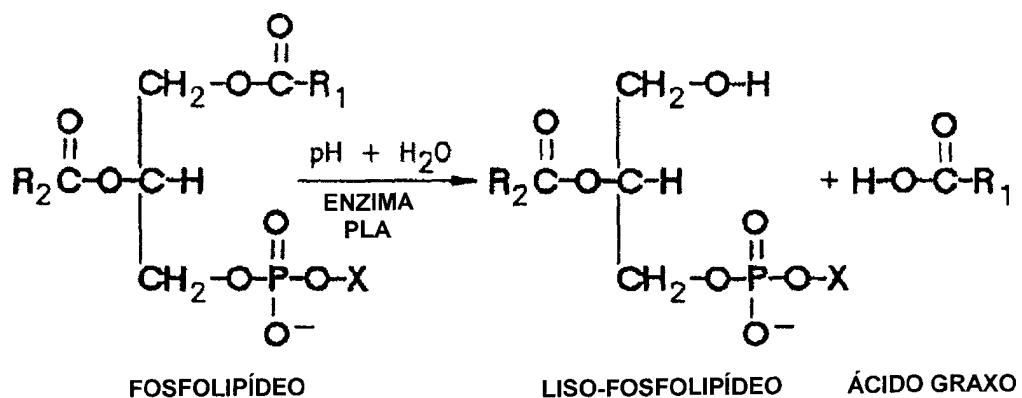


Fig. 4

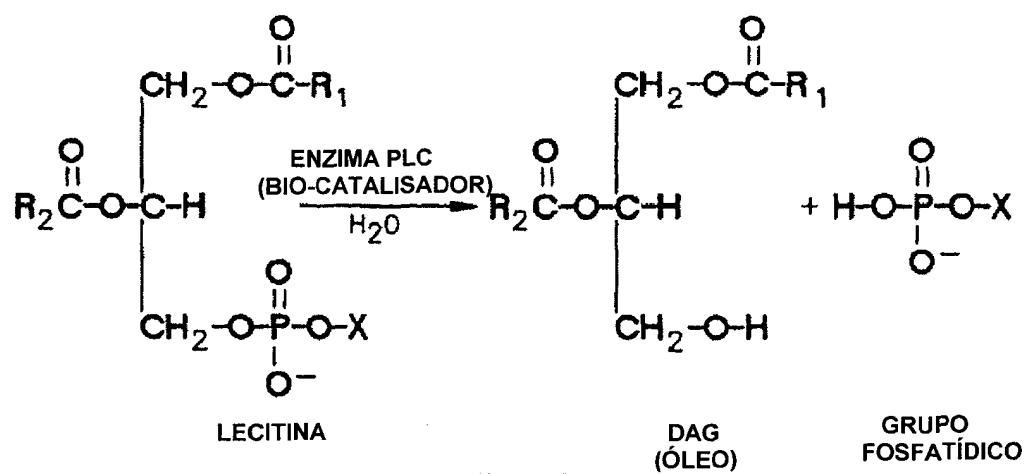


Fig. 5

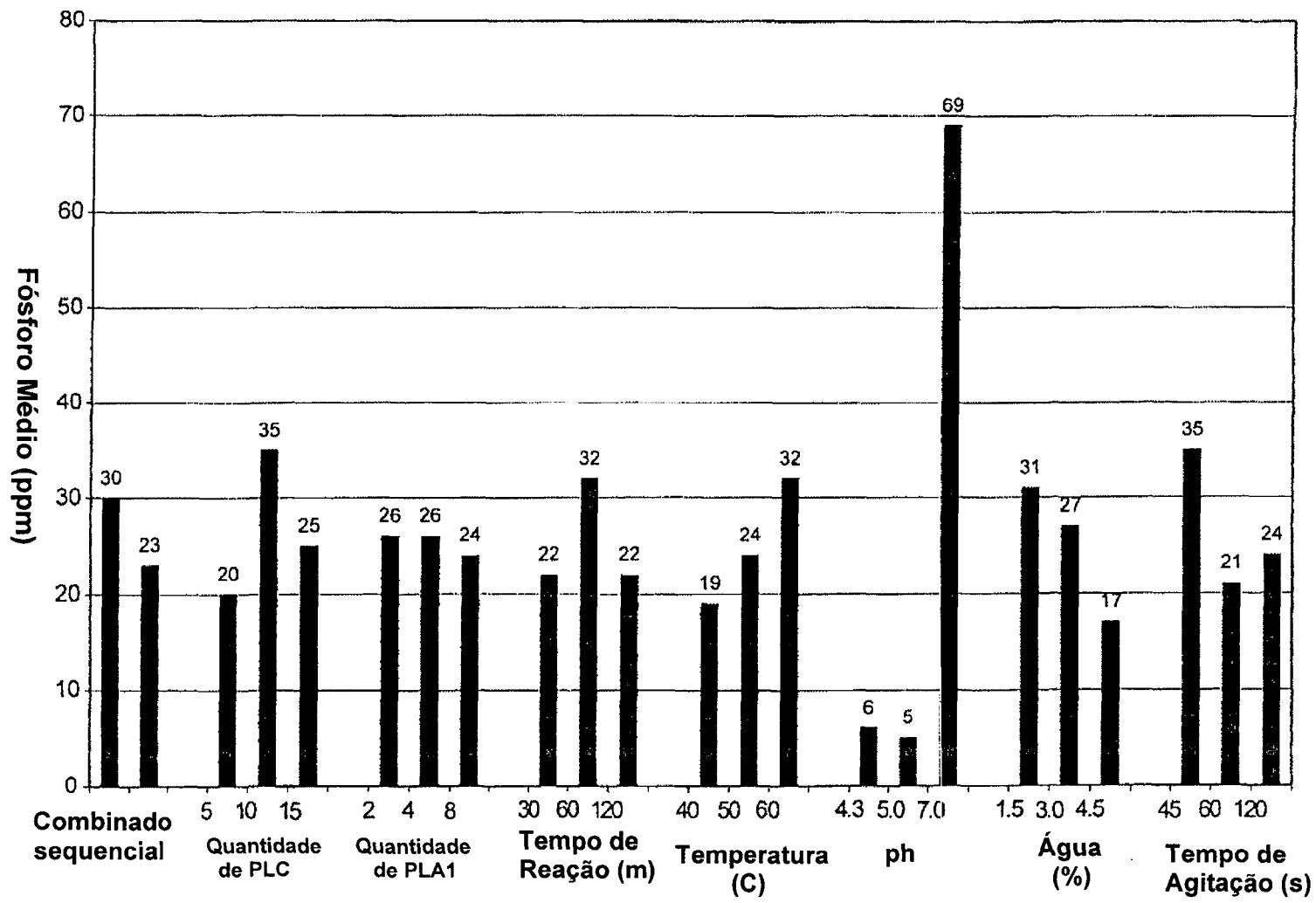


Fig. 6

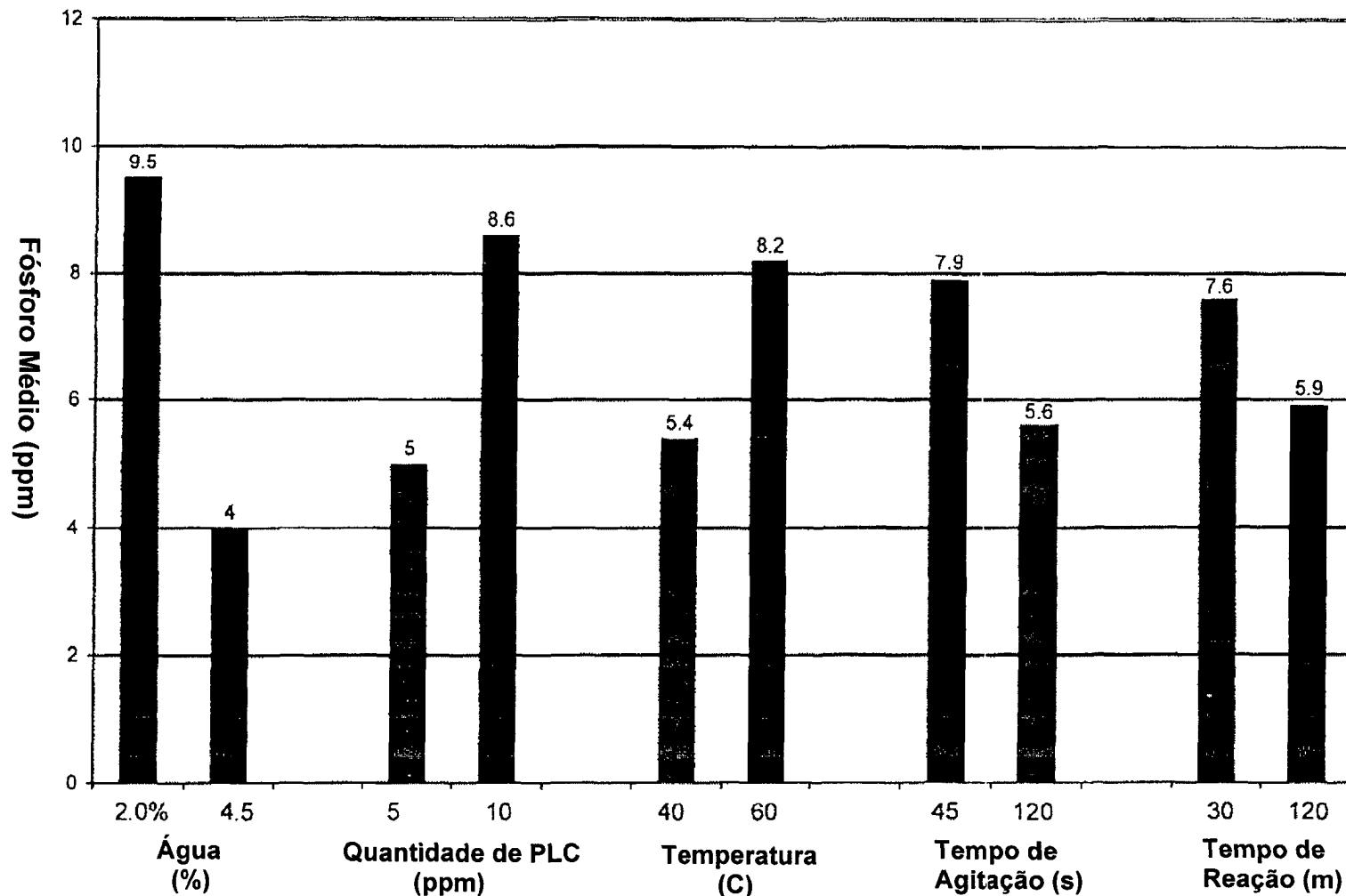


Fig. 7