



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 287 761**

(51) Int. Cl.:
C12P 7/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04764758 .1**

(86) Fecha de presentación : **02.09.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1660668**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

(54) Título: **Procedimiento para la preparación por vía enzimática de agentes emulsionantes que contienen mono- y di-acil-glicéridos.**

(30) Prioridad: **04.09.2003 DE 103 40 739**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2007

(73) Titular/es: **Cargill, Incorporated**
15407 McGinty Road West
Wayzata, Minnesota 55391-1063, US

(72) Inventor/es: **Volland, Michael;**
Lötzbeyer, Thomas;
Sieber, Volker y
Wittmann, Eva

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación por vía enzimática de agentes emulsionantes que contienen mono- y di-acil-glicéridos.

Es objeto del presente invento un procedimiento para la preparación por vía enzimática de emulsionantes que contienen mono- y di-acil-glicéridos, y a la utilización de éstos.

Las lecitinas y lisolecitinas se utilizan como emulsionantes en diferentes aplicaciones. Se encuentran éstas en alimentos, cosméticos, agentes de complemento de la nutrición y formulaciones químicas.

Ellas se obtienen por lo general como productos secundarios de la obtención de aceites, p.ej. a partir de soja o colza, o se extraen directamente a partir de la correspondiente materia prima, tal como p.ej. yema de huevo. Las lecitinas y lisolecitinas constituyen en la mayor parte de los casos una compleja mezcla de fosfolípidos (fosfatos de 1,2-diacil-glicerol), lisofosfolípidos (fosfato de 1- o 2-mono-acil-glicerol como derivado de hidrólisis de fosfolípidos), glicolípidos y triacil-glicéridos. Según sea el proceso de elaboración, los contenidos de las fracciones individuales en el producto final pueden fluctuar en gran manera.

La lecitina bruta constituye una lecitina no normalizada, tal como resulta como producto secundario p.ej. en un molino de aceite al realizar el refinado de un aceite vegetal. La expresión aceite comprende un aceite vegetal refinado o no refinado, un aceite vegetal parcial o totalmente endurecido (hidrogenado) o una grasa animal, todos cuyos componentes principales son triacil-glicéridos.

Los mono-, di- y tri-acil-glicéridos tienen uno, dos o tres grupos acilo, que proceden de un ácido graso saturado, o insaturado una vez o múltiples veces, de cadena larga. Preferiblemente, los grupos acilo tienen de 6 a 35 átomos de C, en particular de 10 a 30 átomos de C, y de manera todavía más preferida de 12 a 26 átomos de C. Los monoacil-glicéridos pueden ser 1- 6 2-monoacil-glicéridos, los diacil-glicéridos pueden representar 1,2- o 1,3-diacil-glicéridos.

Unos contenidos más altos de lisolecitinas se pueden obtener con ayuda de una hidrólisis enzimática de los correspondientes fosfolípidos mediante separación de uno o dos radicales de ácidos grasos para dar los correspondientes lisofosfolípidos.

Como una "lisolecitina" se debe de entender, en el presente contexto así como también en el sentido comercial y de legislación alimentaria, una mezcla de lípidos polares y de lípidos neutros, parcialmente hidrolizados enzimáticamente, que tienen una proporción de material insoluble en acetona de por lo menos 56%. La proporción de material insoluble en acetona es en este contexto uno de los parámetros analíticos más importantes, que se aprovecha para la evaluación legal alimentaria de una lecitina y que describe la proporción de los lípidos polares en la lecitina, que no son solubles en acetona.

La hidrólisis de lípidos y fosfolípidos con lipasas y fosfolipasas ha sido bien descrita (Adlercreutz, Patrick, 1994: "Enzyme-catalyzed lipid modification" [Modificación de lípidos catalizada por enzimas]; Biotechnology & Genetic Engineering Reviews 12, 231-254).

Además de esto, un gran número de documentos de patentes se ocupan asimismo de la hidrólisis por vía enzimática de fosfolípidos para dar lisolecitinas.

El documento de solicitud de patente europea EP-A-260573 describe la preparación de una lisolecitina, en la que una lecitina se mezcla con 5-30% en peso de agua y se hace reaccionar en presencia de una sal de calcio así como de una enzima que hidroliza a la lecitina para dar una lisolecitina.

En el documento de solicitud de patente internacional WO 91/03565 se enseña la hidrólisis de fosfolípidos aislados en el seno de disolventes orgánicos, con ayuda de una lipasa inmovilizada, mientras que el documento EP-A-870840 describe la hidrólisis de una solución acuosa de una lecitina con fosfolipasas, en la que los resultantes lisofosfolípidos son liberados de sustancias acompañantes mediante una extracción con un disolvente (acetona).

Un procedimiento adicional para la preparación de una lisolecitina se describe en el documento de patente japonesa JP 10042884, donde el producto deseado se prepara por hidrólisis de una lecitina mediante una fosfolipasa A2 en una mezcla de un disolvente y de agua.

El documento WO 97/28270 enseña un procedimiento para la preparación de lisofosfatidilcolina a partir del substrato fosfatidilcolina, con ayuda de una fosfolipasa A2. La reacción se lleva a cabo en una dispersión del substrato con un agente adicional seleccionado entre el conjunto formado por los monoacil-glicéridos, los diacil-glicéridos, los ésteres con ácidos grasos de poligliceroles, de sacarosa y de sorbitán, así como por glicerol, en presencia de agua.

Junto a las lecitinas y lisolecitinas, también ciertos mono- y di-acil-glicéridos actúan como estabilizadores para emulsiones. Ellos se obtienen en la mayor parte de los casos mediante una saponificación en condiciones alcalinas de triacil-glicéridos a altas temperaturas. Ellos, no obstante, a continuación de esta etapa de hidrólisis, deben ser purificados de una manera con intensos costos.

Un método alternativo para la preparación de monoacil-glicéridos lo describe el documento WO 02/11543. Con ayuda de una lipasa, a partir del correspondiente triacil-glicérido se obtiene más de un 40% en forma de monoacil-glicéridos en una mezcla de un poliol y de agua. La lecitina así como también las grasas se añaden en este caso exclusivamente para la ampliación del espectro de sustratos.

Por regla general, los mono- y di-acil-glicéridos se emplean para la estabilización de emulsiones en combinación con lisolecitinas en los sectores de los productos de panificación y de las margarinas. Para esto, hasta ahora, en la mayor parte de los casos, los componentes individuales se preparan por separado, se purifican y se mezclan en la concentración deseada.

El documento WO 00/52190 describe un procedimiento para la preparación de una mezcla de lisolípidos, lisofosfolípidos, monoacil-glicéridos y diacil-glicéridos por reacción de una lecitina en una mezcla de agua y de un poliol en presencia de una combinación de una lipasa y de una fosfolipasa. El centro de gravedad de la importancia está situado en este contexto en la conversión lo más completa que sea posible de los fosfolípidos con un grado de conversión de 80%, referido a la relación de lisofosfatidilcolina a fosfatidilcolina. Mediante el alto contenido de agua de la solución de reacción, de aproximadamente 60%, la obtención del producto final está vinculada no obstante con un alto gasto en energía y costos. Un ajuste definido de la relación de una lisolecitina a los mono- y di-acil-glicéridos no es posible sin embargo con este procedimiento, puesto que siempre predomina la porción de lisofosfolípidos, y la proporción de monoacil-glicéridos, mediante la adición del glicerol, siempre resulta esencialmente más alta que la proporción de diacil-glicéridos.

No obstante, la relación entre los mono- y di-acil-glicéridos así como los lisofosfolípidos en el producto que se ha de estabilizar puede variar en gran manera dependiendo de la respectiva aplicación. Así, p.ej. para la estabilización de margarinas, se añaden mono-/di-acil-glicéridos y una lisolecitina en la relación de 1,7:1, al contrario de lo cual en el sector de los productos de panificación predomina la proporción de la lisolecitina, y la correspondiente mezcla se presenta en la relación de 0,4:1.

Partiendo de este estado de los conocimientos, se ha establecido para el presente invento la misión de poner a disposición un procedimiento para la preparación por vía enzimática de emulsionantes que contienen mono- y di-acil-glicéridos, que sin la adición, en caso contrario usual, de calcio, polioles o disolventes orgánicos, permita una preparación barata de mezclas de mono- y di-acil-glicéridos así como de lisofosfolípidos, y que además de esto haga posible un ajuste flexible de la relación entre los mono- y di-acil-glicéridos así como los lisofosfolípidos mediante variación de la composición de la mezcla de reacción o de las condiciones de reacción.

El problema planteado por esta misión se resolvió con un correspondiente procedimiento, en el que

- a) se dispone previamente una mezcla de un componente fosfolípido y de un componente triacil-glicerídico,
- b) a la mezcla procedente de la etapa a) del procedimiento se le añade una cantidad de una solución acuosa que contiene (fosfo-)lipasas, tal que el contenido de agua de la mezcla está situado entre 3 y 15% en peso y en particular entre 5 y 12% en peso, a continuación
- c) la mezcla obtenida a partir de la etapa b) del procedimiento se hace reaccionar a unas temperaturas comprendidas entre 20° y 80°C a lo largo de un período de tiempo de por lo menos 2 horas, y finalmente
- d) la mezcla, después del final de la reacción, se seca.

De modo sorprendente, se ha comprobado, en el caso de la reacción simultánea conforme al invento de fosfolípidos (lecitina) y de triacil-glicéridos (aceite) para dar lisofosfolípidos y mono- así como di-acil-glicéridos, que mediante la elección de los parámetros temperatura, periodo de tiempo de incubación, relación entre lecitina y aceite, entre lecitina y agua o respectivamente entre aceite y agua, o/y la cantidad de enzima añadida, se puede ajustar exactamente la composición del producto de reacción. Así, p.ej. a través de la relación de lecitina a aceite, que se puede definir por medio de la proporción de material insoluble en acetona, es posible, en el caso de una hidrólisis con una lipasa y con una determinada proporción de agua, ajustar planificadamente la proporción de monoacil-glicéridos y de 1,2-diacil-glicéridos en la proporción total de mono-/di-acil-glicéridos, junto con una proporción comparativamente constante de 1,3-diacil-glicéridos. Alternativamente, no obstante, también a través del período de tiempo de incubación, p.ej. a una temperatura de 60°C con 0,05% de una lipasa en una mezcla de una lecitina bruta y un aceite, con una proporción de material insoluble en acetona de 50%, y con una proporción de agua de 10%, se puede hacer variar la proporción de monoacil-glicéridos y de 1,3-diacil-glicéridos en la proporción total de mono-/di-acil-glicéridos, permaneciendo comparativamente constante la proporción de 1,2-diacil-glicéridos en el contenido total de mono-/di-acil-glicéridos. Estas ventajas no se podían esperar en esta magnitud, tomando en consideración la sencillez de la realización del procedimiento.

Como componente fosfolípido se ha manifestado conforme al invento como especialmente apropiada una lecitina y preferiblemente una lecitina bruta, habiéndose de considerar como especialmente preferida una lecitina bruta de soja.

ES 2 287 761 T3

Los aceites vegetales y/o animales, preferiblemente en una forma refinada y/o por lo menos parcialmente endurecida, son representantes especialmente apropiados en el marco del presente invento del componente triacil-glicerídico, tal como se dispone previamente en la etapa a) del procedimiento.

En lo que se refiere a la realización del procedimiento, en una variante especial en la etapa a) del procedimiento, se puede disponer previamente una mezcla que contiene una proporción del componente fosfolipídico comprendida entre 10 y 80% en peso y una proporción del componente triacil-glicerídico comprendida entre 20 y 90% en peso. La relación en peso entre la proporción del componente fosfolipídico y la proporción del componente triacil-glicerídico es ventajosamente de 1:0,25 a 1:4.

En general, la etapa a) del procedimiento no está sometida a ninguna restricción especial, pero en ciertas condiciones puede ser ventajoso que la mezcla sea llevada en la etapa a) del procedimiento a una temperatura comprendida entre 35° y 60°C, lo cual también lo considera asimismo el presente invento.

En lo que se refiere a la etapa b) del procedimiento, se ha de considerar como preferido que se emplee una lipasa y/o fosfolipasa de origen microbiano, preferiblemente procedente de *Candida* y/o *Aspergillus*. Cepas especialmente apropiadas son en este contexto *Aspergillus niger* y *Candida cylindracea*, pudiendo escogerse naturalmente también cualquier otra apropiada fuente de enzimas.

Tal como ya se ha expuesto, una gran ventaja del presente procedimiento consiste en que la relación de mono- y diacil-glicéridos en el producto que actúa emulsionando se puede ajustar de una manera planificada. El invento prevé por lo tanto también que en la etapa b) del procedimiento se emplee una cantidad de una (fosfo)lipasa de 0,05 a 10,0 mg por ml de la mezcla de reacción, y en particular de 0,1 a 5 mg por ml de la mezcla de reacción. La cantidad de enzima en cada caso deseada se puede emplear en este contexto evidentemente también dependiendo de la actividad enzimática, por lo cual es recomendable una correspondiente cantidad entre 0,1 y 120 µg por ml de mezcla de reacción. Por lo general, la relación de la lipasa a la fosfolipasa en el componente enzimático que se emplea, se puede hacer variar en un amplio intervalo, con lo cual se puede ejercer planificadamente influencia sobre la composición del producto (del emulsionante) obtenido.

Se ha de considerar como preferida, en lo que se refiere a la etapa c) del procedimiento, una temperatura que está situada entre 40 y 50°C. La duración de la reacción en la etapa c) del procedimiento debería estar situada ventajosamente entre 5 y 20 horas y de manera especialmente preferida entre 8 y 12 horas.

La etapa de desecación d) final, en el presente invento, de nuevo no es en general limitadora y se puede llevar a cabo con cualquier procedimiento usual. Sin embargo, debería procurarse disponer de unas condiciones moderadas, por lo cual son especialmente apropiadas unas temperaturas que están situadas entre 60° y 80°C. La realización de la desecación en un vacío es especialmente recomendable.

Típicamente, el procedimiento conforme al invento se lleva a cabo reuniendo una lecitina con un aceite en una relación específica, atemperando a una temperatura entre 35° - 60°C y mezclando mediante agitación. Una fuente posible para la lecitina es en este contexto una lecitina bruta procedente de soja, pudiéndose utilizar en vez de una lecitina bruta también una lecitina normalizada, desaceitada o fraccionada. Como aceite entran en cuestión aceites vegetales, tales como p.ej. un aceite de soja, o un aceite vegetal hidrogenado, tal como p.ej. una grasa de palma, o sin embargo también aceites y grasas animales. El componente enzimático es añadido como una lipasa en una solución acuosa a la mezcla de la lecitina y el aceite, estando situada la proporción total de agua, preferiblemente, en el intervalo de 6 a 12% en peso. Posibles fuentes para enzimas lipasas son en este contexto en particular *Candida cylindracea* (compárese Biocatalysts [Biocatalizadores], Pontypridd, Gales) o *Aspergillus niger* (compárese Amano, Nagoya, Japón). La mezcla de reacción es agitada a continuación a una temperatura determinada y durante un período de tiempo determinado, pudiendo la temperatura estar situada p.ej. en el intervalo de 50°C. Como período de tiempo de incubación, está previsto preferiblemente un intervalo comprendido entre 2 y 15 horas. Después de haber transcurrido esta reacción, la mezcla es secada en vacío a una temperatura de aproximadamente 70°C, y el producto, eventualmente, es todavía cristalizado.

Como producto preferido se reivindica por el presente invento una mezcla que se compone de una lisolecitina y de mono- y diacil-glicéridos, debiendo estar situadas las proporciones preferidas, en lo referente a la lisolecitina entre 3,0 y 55% en peso, y en lo referente a los monoacil-glicéridos entre 2,0 y 20% en peso. En lo referente a la proporción de diacil-glicéridos se recomiendan unas proporciones que están situadas entre 6,0 y 40% en peso.

Alternativamente, el invento prevé, como producto del procedimiento reivindicado, una mezcla, en la que la relación del componente fosfolipídico a los componentes mono- y diacil-glicerídicos combinados es de 1:0,25 a 4,0.

Los productos de reacción, después de la desecación, se pueden utilizar directamente como emulsionantes en procedimientos clásicos para la producción de margarinas o mezclas de panificación. En este caso no se necesita ninguna adición de otros componentes tales como p.ej. mono- o diacil-glicéridos adicionales.

Junto al procedimiento propiamente dicho y a las mezclas preparadas con el mismo, el presente invento, de acuerdo con la reivindicación 14, reivindica también la utilización de las mezclas que se pueden preparar con el procedimiento para la preparación de emulsiones y cremas en el sector alimentario, en particular en forma de helados mantecados, margarinas y productos de panificación, y en el sector de los cosméticos.

En el marco de este invento, se encontró finalmente que los productos y, por consiguiente, el emulsionante, al contrario que los emulsionantes obtenibles hasta ahora, que se preparan mediante mezcladura de los componentes puros de una lisolecitina y de mono-/di-acil-glicéridos, pueden presentarse también en forma líquida, y que por lo tanto se pueden utilizar con facilidad sin ningún tratamiento ulterior, y sin experimentar en este caso mermas de calidad.

Con el procedimiento reivindicado, mediante la reacción enzimática simultánea de fosfolípidos (lecitina) y de triacil-glicéridos (aceite) a lisofosfolípidos y mono- y di-acil-glicéridos, se consigue de una manera sencilla la preparación de emulsionantes. La conversión de una lecitina en una lisolecitina se efectúa en este contexto a través de una hidrólisis por vía enzimática, sin que para esto se tengan que añadir disolventes orgánicos, polioles y/o calcio, o sin que se tenga utilizar una proporción de agua > 15% en peso. Además de esto, en el marco del procedimiento conforme al invento es posible con precisión de objetivo un ajuste exacto de las proporciones de componentes lipídicos individuales en el producto, haciéndose variar ciertos parámetros iniciales seleccionados. Finalmente, una ventaja adicional del invento ha de ser vista en el hecho de que los emulsionantes así obtenidos se pueden obtener también directamente en una forma líquida.

En el caso del procedimiento descrito para la preparación por vía enzimática de emulsionantes que contienen mono- y di-acil-glicéridos, en una primera etapa a) del procedimiento, se dispone previamente una mezcla de un componente fosfolipídico y de un componente triacil-glicerídico, a continuación en la etapa b) del procedimiento, a la mezcla obtenida de esta manera se le añade una cantidad de una solución acuosa que contiene (fosfo)lipasas, tal que el contenido de agua de la mezcla está situado entre 3 y 15% en peso. A continuación, en la etapa c) del procedimiento, la mezcla obtenida a partir de la etapa precedente se lleva a reaccionar a unas temperaturas comprendidas entre 20° y 80°C durante un período de tiempo de por lo menos dos horas, y finalmente esta mezcla se seca. Como componentes especialmente apropiados se han mostrado una lecitina bruta de soja y aceites vegetales y/o animales, que se hacen reaccionar en común con una mezcla de una lipasa y/o una fosfolipasa como componente enzimático. Con este procedimiento, que se contenta sin los disolventes orgánicos, los polioles ni los aditivos iónicos en caso contrario usuales, así como con una pequeña proporción de agua, se obtienen unos emulsionantes, cuya composición a base de lisofosfolípidos y mono- y di-acil-glicéridos se puede ajustar de una manera planificada. Estos emulsionantes, que también son obtenibles en forma líquida, encuentran su empleo en los sectores alimentario y cosmético.

Los siguientes Ejemplos ponen de manifiesto las ventajas mencionadas del procedimiento reivindicado para la preparación por vía enzimática de emulsionantes.

Ejemplos

La lecitina bruta utilizada en los siguientes Ejemplos procedía de Honeyamead, EE.UU.; y en el caso del aceite de soja se trataba de productos usuales en el comercio libremente adquiribles.

La composición de los productos en cada caso obtenidos se analizó con ayuda de la HPLC, de la HPTLC y con métodos gravimétricos.

Para la HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) se utilizó como fase estacionaria una columna con gel de sílice Si60. La fase móvil se componía de una mezcla de n-hexano, 2-propanol y agua (0,25/4/1 [v/v/v], v = volumen), que se vertía sobre la columna con un caudal de 1,2 ml/min. Con ayuda de los diferentes períodos de tiempo de retención, se pudieron cuantificar los contenidos de fosfatidilcolina y de lisofosfatidilcolina. Las muestras fueron previamente disueltas en mezclas de n-hexano y 2-propanol (2/1 [v/v]).

La HPTLC (cromatografía de capa fina de alto rendimiento) se llevó a cabo con gel de sílice Si60, aplicado sobre una placa de vidrio (con el formato 20 x 10 cm) como fase estacionaria. Como fase móvil sirvió una mezcla de dietiléter, bencina de petróleo y ácido acético glacial en la relación de 40/59/1 [v/v/v]. Después de la fase de análisis y de la desecación de la placa, las bandas obtenidas se derivatizaron con una solución de sulfato de cobre-(II) (10% en peso de sulfato de cobre disuelto en ácido fosfórico al 8%) y se cuantificó el contenido de monoacil-glicéridos así como el de 1,2- y 1,3-diacil-glicéridos. Las muestras fueron previamente disueltas en cloroformo.

El método gravimétrico se empleó para la determinación de la proporción de material insoluble en acetona. En este caso, la muestra se mezcló con acetona, el residuo obtenido se separó, se secó y se pesó.

Ejemplo 1

45 g de una lecitina bruta se mezclaron con 55 g de un aceite de soja y se agitaron a una temperatura de 47,5°C. Se disolvieron 0,13 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* (de Biocatalysts, Reino Unido) en 9 g de agua, y a continuación se añadieron mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 47,5°C y, después de un período de tiempo de reacción de 8,5 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 80°C.

Resultado: El producto obtenido contenía 28% en peso de material insoluble en acetona, lo que corresponde a una proporción de lecitina de 43%, y además 2% en peso de lisofosfatidilcolina, 4,5% en peso de monoacil-glicéridos y 11% en peso de diacil-glicéridos. La relación de lecitina a mono-/di-acil-glicéridos fue de 1:0,34.

ES 2 287 761 T3

Ejemplo 2

135 g de una lecitina bruta se mezclaron con 165 g de un aceite de soja y con 27 g de agua y se agitaron a una temperatura de 47,5°C. Se añadieron, mediando agitación, 0,15 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 47,5°C y, después de un período de tiempo de reacción de 8,5 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 80°C.

Resultado: El producto obtenido contenía 27% en peso de material insoluble en acetona, lo que corresponde a una proporción de lecitina de 42%, y además 2,5% en peso de lisofosfatidilcolina, 5% en peso de monoacil-glicéridos y 10% en peso de diacil-glicéridos. La relación de lecitina a mono-/di-acil-glicéridos fue de 1:0,36.

Ejemplo 3

10 g de una lecitina bruta se mezclaron con 90 g de un aceite de soja y se agitaron a una temperatura de 35°C. Se disolvieron 0,1 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* en 12 g de agua y a continuación se añadieron mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 35°C y, después de un período de tiempo de reacción de 15 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 60°C.

Resultado: El producto obtenido contenía 6% en peso de material insoluble en acetona, lo que corresponde a una proporción de lecitina de 9,5%, y además 0,2% en peso de lisofosfatidilcolina, 4% en peso de monoacil-glicéridos y 10% en peso de diacil-glicéridos. La relación de lecitina a mono-/di-acil-glicéridos fue de 1:1,5.

Ejemplo 4

30 g de una lecitina bruta se mezclaron con 270 g de un aceite de soja y se agitaron a una temperatura de 60°C. Se disolvieron 0,3 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* en 18 g de agua y a continuación se añadieron mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 60°C y, después de un período de tiempo de reacción de 15 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 80°C.

Resultado: El producto obtenido contenía 6% en peso de material insoluble en acetona, lo que corresponde a una proporción de lecitina de 9,5%, y además 0,2% en peso de lisofosfatidilcolina, 2% en peso de monoacil-glicéridos y 12% en peso de diacil-glicéridos. La relación de lecitina a mono-/di-acil-glicéridos fue de 1:1,5.

Ejemplo 5

70 g de una lecitina bruta se mezclaron con 30 g de un aceite de soja y se agitaron a una temperatura de 35°C. Se disolvieron 0,1 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* en 12 g de agua y a continuación se añadieron mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 35°C y, después de un período de tiempo de reacción de 2 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 60°C.

Resultado: El producto obtenido tenía una proporción de material insoluble en acetona de 45% y contenía 3% en peso de lisofosfatidilcolina, 6,5% en peso de monoacil-glicéridos y 9% en peso de diacil-glicéridos.

Ejemplo 6

75 g de una lecitina bruta se mezclaron con 25 g de un aceite de soja y se agitaron a una temperatura de 47,5°C. Se disolvieron 0,05 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* en 9 g de agua y a continuación se añadieron mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 47,5°C durante un período de tiempo de 8,5 h, y a continuación se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 80°C.

Resultado: El producto obtenido tenía una proporción de material insoluble en acetona de aproximadamente 50% en peso y contenía 4% en peso de lisofosfatidilcolina, 5% en peso de monoacil-glicéridos y 6% en peso de diacil-glicéridos.

Ejemplo 7

225 g de una lecitina bruta se mezclaron con 275 g de un aceite de soja y se agitaron a una temperatura de 47,5°C. Se disolvieron 0,25 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* en 70 g de agua y a continuación se añadieron mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 47,5°C y, después de un período de tiempo de reacción de 8,5 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 80°C.

Resultado: El producto obtenido tenía una proporción de material insoluble en acetona de aproximadamente 30% en peso y contenía 2% en peso de lisofosfatidilcolina, 8% en peso de monoacil-glicéridos y 8,5% en peso de diacil-glicéridos.

ES 2 287 761 T3

Ejemplo 8

70 g de una lecitina bruta se mezclaron con 30 g de un aceite de soja y se agitaron a una temperatura de 60°C. Se disolvieron 0,1 g de una lipasa procedente de *Aspergillus niger* en 12 g de agua y a continuación se añadieron
5 mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 60°C y, después de un período de tiempo de reacción de 15 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 60°C.

Resultado: El producto obtenido tenía una proporción de material insoluble en acetona de aproximadamente 45%
10 en peso y contenía 3% en peso de lisofosfatidilcolina, 5% en peso de monoacil-glicéridos y 10% en peso de diacil-glicéridos.

Ejemplo 9

70 g de una lecitina bruta se mezclaron con 30 g de una grasa de palma endurecida y se agitaron a una temperatura
15 de 45°C. Se disolvieron 0,05 g de una lipasa procedente de *Candida cylindracea* en 10 g de agua y a continuación se añadieron mediando agitación a la mezcla de la lecitina y del aceite. Esta mezcla se agitó a 45°C y, después de un período de tiempo de reacción de 8 h, se secó bajo un vacío de 0,1 bar y a una temperatura de 60°C. A continuación, el producto se enfrió y se separó por cristalización.

Resultado: El emulsionante contenía una proporción de material insoluble en acetona de aproximadamente 45%
20 en peso y además 3% en peso de lisofosfatidilcolina, 5% en peso de monoacil-glicéridos y 10% en peso de diacil-glicéridos.

Ejemplo 10

(Ejemplo de aplicación)

El emulsionante preparado de acuerdo con el Ejemplo 9 se empleó en un procedimiento normalizado para la
30 producción de una margarina de acuerdo con la siguiente receta:

47,5% en peso	de un aceite de soja
31,5% en peso	de un aceite de palma
19,8% en peso	de agua
0,1% en peso	de cloruro de sodio
0,07% en peso	de proteína de plasma lácteo
0,03% en peso	de ácido cítrico,
1,0% en peso	de un emulsionante.

Resultado: Se obtuvo una margarina que ha de equipararse a las margarinas clásicas en lo que se refiere a la textura,
45 al comportamiento de fusión y a la aptitud para extenderse.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación por vía enzimática de emulsionantes que contienen mono- y di-acil-glicéridos,
5 **caracterizado** porque
 - a) se dispone previamente una mezcla a base de un componente fosfolipídico y de un componente triacil-glicerídico,
 - 10 b) a la mezcla procedente de la etapa a) del procedimiento se le añade una cantidad de una solución acuosa que contiene una (fosfo-)lipasa, tal que el contenido de agua de la mezcla está situado entre 3 y 15% en peso,
 - c) la mezcla obtenida de la etapa b) del procedimiento se lleva a reaccionar a unas temperaturas comprendidas entre 20° y 80°C durante un período de tiempo de por lo menos 2 horas, y finalmente
 - 15 d) la mezcla, después del final de la reacción, se seca.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque como componente fosfolipídico se utiliza una lecitina, preferiblemente una lecitina bruta y de manera especialmente preferida una lecitina bruta de soja.
- 20 3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque como componente triacil-glicerídico se emplea un aceite vegetal y/o animal, preferiblemente en una forma refinada y/o por lo menos parcialmente endurecida.
- 25 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque en la etapa a) del procedimiento se dispone previamente una mezcla con una proporción de componente fosfolipídico comprendida entre 10 y 80% en peso.
- 30 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque en la etapa a) del procedimiento se dispone previamente una mezcla con una proporción de componente triacil-glicerídico comprendida entre 20 y 90% en peso.
- 35 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque la mezcla, en la etapa a) del procedimiento, se lleva a una temperatura comprendida entre 35 y 60°C.
- 40 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque en la etapa b) de procedimiento se emplea una lipasa y/o fosfolipasa de origen microbiano, preferiblemente procedente de Candida y/o Aspergillus.
- 45 8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque se utiliza una cantidad de (fosfo)lipasa de 0,05 a 10 mg/ml.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque en la etapa c) del procedimiento se ajusta una temperatura comprendida entre 40° y 50°C.
- 50 10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la duración de la reacción en la etapa c) del procedimiento está situada entre 5 y 20 horas.
11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque la etapa de desecación d) se lleva a cabo a unas temperaturas comprendidas entre 60 y 80°C.
- 55 12. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque se obtiene una mezcla de una lisolecitina y de mono- y di-acil-glicéridos en unas proporciones preferentes comprendidas entre 3,0 y 75% en peso de la lisolecitina, de 2,0 a 20% en peso de monoacil-glicéridos y de 6,0 a 40% en peso de diacil-glicéridos.
- 60 13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado** porque se obtiene una mezcla con una relación de componente fosfolipídico a componente mono- y di-acil-glicerídico de 1:0,25 a 4,0.
14. Procedimiento para la preparación de emulsiones y cremas en el sector alimentario, en particular en forma de helados mantecados, margarinas y productos de panificación, y en el sector cosmético, que comprende
 - i) la preparación por vía enzimática de emulsionantes que contienen mono- y di- acil-glicéridos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, y
 - 65 ii) la preparación de emulsiones y cremas en el sector alimentario, en particular en forma de helados comestibles, margarinas y productos de panificación, y en el sector cosmético, mediando empleo de los emulsionantes contenidos en i).