

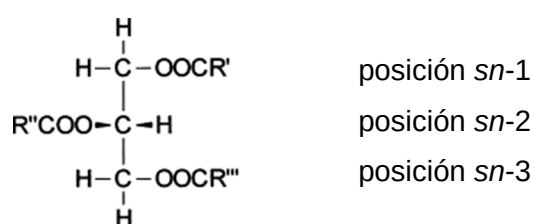
PROCESO ENZIMÁTICO PARA AUMENTAR EL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS SOS DE UN ACEITE VEGETAL

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un proceso para aumentar el contenido de triglicéridos SOS de un aceite vegetal y a composiciones de triglicéridos obtenibles mediante el proceso. Las composiciones de triglicéridos que tienen un alto contenido de SOS son útiles como equivalentes de manteca de cacao, o componentes de la misma, utilizados en la fabricación de chocolate y productos similares al chocolate.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los triglicéridos comprenden tres residuos de ácidos grasos unidos a un esqueleto de glicerol. Su estructura se puede describir utilizando la notación “*sn*”, que representa la numeración estereoespecífica. En una proyección de Fischer de un derivado natural de L-glicerol, el grupo hidroxilo secundario se muestra a la izquierda de C-2; el átomo de carbono por encima de este se convierte entonces en C-1 y el de abajo se convierte en C-3. El prefijo “*sn*” se coloca antes del nombre de la raíz del compuesto.



Proyección de Fischer de un derivado natural de L-glicerol.

Las propiedades físicas de un triglicérido dependen de la naturaleza de los residuos de ácidos grasos y de sus posiciones en el esqueleto de glicerol. Por lo tanto, puede ser deseable proporcionar procesos que alteren el tipo y la posición de los residuos de ácidos grasos en los aceites vegetales.

Las composiciones de triglicéridos que tienen un alto contenido de triglicéridos SOS (donde S representa residuos de ácido esteárico (C18:0) y ácido palmítico (C16:0) y O representa residuos de ácido oleico (C18:1)) son productos particularmente valiosos desde el punto de vista comercial. Los triglicéridos SOS están presentes en un alto nivel en la manteca de cacao y contribuyen a las propiedades físicas características del chocolate. En consecuencia, las composiciones de triglicéridos que tienen un alto contenido de triglicéridos SOS pueden ser útiles como equivalentes de manteca de cacao o componentes de la misma.

La manteca de karité se utiliza comercialmente como fuente de triglicéridos SOS, en particular cuando los residuos de ácidos grasos saturados S son residuos de ácido esteárico. La manteca de karité se obtiene del árbol de manteca de karité *Butyrospermum parkii* y se puede fraccionar para proporcionar estearina de karité, que tiene un nivel más alto de triglicéridos SOS y, por lo tanto, es útil en la producción de equivalentes de manteca de cacao. La disponibilidad de estearina de karité depende del suministro de nueces de karité.

Se conocen métodos de transesterificación enzimática para producir composiciones de triglicéridos que tienen un alto contenido de triglicéridos SOS. Dichos métodos proporcionan una fuente de triglicéridos SOS, que no depende de la disponibilidad de nueces de karité.

El documento US4268527A divulga un método para producir un sustituto de manteca de cacao mediante la transesterificación de grasas y aceites utilizando lipasa específica de *sn*-1,3 y ésteres de alcohol alifático de ácido esteárico y ácido palmítico como fuente de residuos de ácido esteárico y palmítico. El proceso utiliza grasas y aceites que tienen un alto contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2, pero la mayoría de los cuales ya contienen un nivel relativamente alto de residuos de ácido esteárico y palmítico en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, como aceite de palma fraccionado y grasa de sal. El contenido de agua de la mezcla de reacción no es más

del 0.18 % en peso. Para obtener un sustituto de manteca de cacao satisfactorio, los ácidos grasos y sus ésteres de alcohol alifático se separan por destilación y la composición resultante se somete a fraccionamiento.

El documento EP2251428B1 divulga un proceso para elaborar una composición que tiene una alta concentración de SOS (50-80 % en peso) a partir de trioleína, por ejemplo aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico, ácido esteárico y una enzima específica de *sn*-1,3 de *Rhizopus oryzae*. Las temperaturas utilizadas están preferentemente entre 65-80 °C, y los triglicéridos interesterificados se fraccionan mediante fraccionamiento con disolventes.

El documento WO 2010/053244 A1 divulga equivalentes de manteca de cacao producidos mediante interesterificación enzimática de una amplia variedad de grasas y aceites con ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos utilizando una enzima específica de *sn*-1,3, destilación de reactivos y fraccionamiento para separar el producto. La relación molar de grasa o aceite a ácido graso o éster de ácido graso está en el intervalo de 1:2 a 1:6, la temperatura utilizada para la reacción está entre 40-50 °C y el contenido de agua del aceite está por debajo del 0.02 %.

El documento KR101344491B1 divulga un método para producir una composición de aceite y grasa para equivalentes de manteca de cacao (CBE) o mejoradores de manteca de cacao (CBI) que comprende una primera etapa de preparación de un aceite mixto mezclando ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos con aceites o grasas; una Segunda etapa de transesterificación del aceite mixto mediante el uso de una enzima específica de *sn*-1,3 a una temperatura de 20 °C inferior a 20 °C superior al punto de fusión del aceite mixto (normalmente 40-70 °C); y una tercera etapa de eliminación de los reactivos secundarios mediante destilación molecular y fraccionamiento después de la reacción de transesterificación.

El documento EP2508078A1 divulga un método para la preparación de

grasas que tienen un alto contenido de triglicéridos POS (en los que P representa ácido palmítico y S representa ácido esteárico) mediante transesterificación enzimática de grasa o aceite vegetal con un ácido graso o un derivado de ácido graso, destilación para eliminar el ácido graso o el derivado de ácido graso y luego fraccionamiento. La grasa o aceite vegetal preferido es el aceite de palma o una fracción del mismo.

El documento GB2205850B divulga un proceso de interesterificación enzimática con un bajo contenido de agua, que comprende someter un líquido de reacción que contiene (a) una grasa o aceite y (b) un miembro seleccionado del grupo que consiste en (i) otra grasa o aceite, (ii) un éster de ácido graso con un alcohol inferior y (iii) un ácido graso, a la acción de una lipasa en forma de un catalizador enzimático inmovilizado, ajustando la concentración de agua en el líquido de reacción durante la reacción.

El documento EP 245076 A2 divulga un proceso para la preparación de grasas comestibles adecuadas para su uso en confitería, mediante la reorganización de aceites y grasas de glicéridos insaturados que tienen un alto contenido de oleato utilizando una enzima lipasa en presencia de ácidos grasos saturados o ésteres de los mismos (un “reactivo de acidólisis”). Preferentemente, se utilizan de 1 a 5 moles de reactivo de acidólisis por mol de aceite, más preferentemente de 3 a 5 moles por mol. En los procesos ejemplificados, las relaciones de peso del reactivo de acidólisis con el aceite son 1:1 (Ejemplo 1), 1:2.5 (Ejemplo 3) y 2.4:2.5 (Ejemplo 4).

Por lo tanto, los procesos enzimáticos conocidos para producir composiciones de triglicéridos que contienen un alto contenido de triglicéridos SOS generalmente implican fraccionamiento para lograr una composición apropiada de triglicéridos (ya sea fraccionamiento en seco o fraccionamiento con disolvente). El fraccionamiento con disolventes puede producir productos de buena calidad, pero el costo de construcción de este proceso es alto y el uso de disolventes puede crear problemas de seguridad

y aceptación por parte del cliente. El fraccionamiento en seco es una alternativa más viable económicamente, pero no tan eficiente en la separación de triglicéridos SOS. Esto da como resultado la necesidad de recircular el producto, lo que aumenta los costos del proceso. Una mayor recirculación también significa una mayor formación de subproductos y, por lo tanto, también una disminución del rendimiento general. Puede ser necesario más de una etapa de fraccionamiento para lograr la calidad deseada. En consecuencia, ambos tipos de fraccionamiento son etapas de proceso complejos y costosos que afectan a la economía del proceso.

Por lo tanto, existe la necesidad de un proceso de transesterificación enzimática más eficiente, que produzca una composición de triglicéridos adecuada para su uso como equivalente de manteca de cacao, o un componente de la misma, con una economía de proceso mejorada y menos etapas de proceso, y donde no haya necesidad de fraccionamiento de la composición de triglicéridos resultante de la transesterificación enzimática. También es deseable proporcionar un proceso de transesterificación enzimática que pueda utilizar aceite de alto contenido de ácido oleico como material de partida y que, por lo tanto, no requiera el uso de aceites vegetales que ya contengan un alto nivel de ácido esteárico y/o palmítico, como la estearina de karité o el aceite de palma.

RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores han descubierto sorprendentemente que, mediante el uso de reactivos y condiciones particulares en un proceso de transesterificación enzimática, es posible proporcionar una composición de triglicéridos que comprenda un alto nivel de triglicéridos SOS y que se pueda utilizar como un equivalente de manteca de cacao, o un componente de la misma, después de simplemente separar los ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos libres, sin la necesidad de fraccionamiento de la fase de triglicéridos.

En consecuencia, la invención proporciona un proceso para aumentar el

contenido de triglicéridos SOS de un aceite vegetal, en el que S representa residuos de ácido esteárico (C18:0) y ácido palmítico (C16:0) y O representa residuos de ácido oleico (C18:1), comprendiendo dicho proceso:

- a) proporcionar un entorno de reacción que comprende:
 - i) una lipasa específica de *sn*-1,3 inmovilizada sobre un soporte,
 - ii) un aceite vegetal, en el que el aceite vegetal comprende por lo menos un 45 % de residuos de ácido graso de ácido oleico, en base a los residuos de ácido graso C6-C24 totales, y en el que el aceite vegetal tiene un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 de por lo menos un 75 % en peso de los residuos de ácido graso *sn*-2 totales del aceite vegetal, y
 - iii) un éster de alcohol alifático de ácido esteárico, ácido palmítico o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con ácido esteárico y/o ácido palmítico, y
 - iv) agua;en donde la relación de peso del éster de alcohol alifático y ácido esteárico y/o ácido palmítico opcionales (iii) con respecto al aceite vegetal (ii) es por lo menos 4:1; y
en donde la actividad de agua del entorno de reacción está en el intervalo de 0.1 a 0.6;
- b) calentar el entorno de reacción a una temperatura de 30-60 °C para realizar la transesterificación, obteniendo así una mezcla que comprende una fase de triglicéridos, ésteres de ácidos grasos y, opcionalmente, ácidos grasos libres; y
- c) separar los ésteres de ácidos grasos y, cuando estén presentes, los ácidos grasos libres de la mezcla obtenida en la etapa (b) para obtener una composición de triglicéridos.

El proceso divulgado en el presente documento puede producir una fase de triglicéridos que tiene un contenido de SOS de por lo menos el 65 % en peso de la fase de triglicéridos. Además, se puede minimizar la producción indeseable de triglicéridos SSO de manera que la fase de triglicéridos de la mezcla obtenida en la etapa (b) tenga una relación en peso de triglicéridos

SOS a triglicéridos SSO de por lo menos 80:1. También se puede minimizar la producción indeseable de triglicéridos SSS, de manera que la fase de triglicéridos de la mezcla pueda tener un contenido de triglicéridos SSS de ≤ 4 % en peso de la fase de triglicéridos. Estas cantidades y relaciones se calculan en peso sobre la base de la fase de triglicéridos de la mezcla. La composición de triglicéridos es adecuada para su uso como un equivalente de manteca de cacao o un componente de la misma.

Las etapas del proceso anterior pueden ser seguidas por cualquiera de las tres etapas alternativas d1), d2) y d3), donde los ésteres de ácidos grasos y, opcionalmente, los ácidos grasos libres, de la etapa c) son devueltos al entorno de reacción de la etapa a) con el fin de ser utilizados como subestados para la transesterificación:

- d1) recirculando los ésteres de ácidos grasos y, cuando estén presentes, los ácidos grasos libres separados en la etapa (c) al entorno de reacción;
- d2) si el éster de alcohol alifático (iii) comprende un éster de alcohol alifático de ácido esteárico, opcionalmente mezclando con ácido esteárico, hidrogenando los ésteres de ácidos grasos y, cuando estén presentes, los ácidos grasos libres separados en la etapa (c) y recirculando los ésteres de ácidos grasos hidrogenados y los ácidos grasos libres al entorno de reacción;
- d3) separando los ésteres de ácidos grasos y, cuando estén presentes, los ácidos grasos libres separados en la etapa (c) en:
una primera fracción que comprende éster de estearato y/o palmitato, y opcionalmente ácido esteárico y/o ácido palmítico; y
una segunda fracción que comprende éster de oleato y opcionalmente ácido oleico; y recirculación la primera fracción al entorno de reacción.

Cuando el éster de alcohol alifático (iii) comprende un éster de alcohol alifático de ácido esteárico, opcionalmente mezclado con ácido esteárico, el proceso también puede comprender una etapa adicional (e3) de hidrogenación de la segunda fracción para proporcionar éster de estearato y opcionalmente ácido esteárico y recirculación de la segunda fracción hidrogenada al entorno de reacción.

El aceite vegetal (ii) puede seleccionarse entre aceite de colza/canola con alto contenido de ácido oleico, aceite de oliva, aceite de soya con alto contenido ácido oleico, aceite de girasol con alto contenido ácido oleico, aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, aceite de karité o aceite de colza, y/o fracciones o combinaciones de los mismos. Preferentemente, el aceite vegetal (ii) se selecciona entre aceite de girasol con alto contenido ácido oleico, aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico y/o combinaciones o fracciones de los mismos.

El proceso puede comprender además el uso de la composición de triglicéridos obtenida en la etapa (c) como un equivalente de manteca de cacao o un componente de la misma en la fabricación de un chocolate o un producto similar al chocolate.

La invención también proporciona una composición de triglicéridos que se puede obtener mediante el proceso.

La invención también proporciona un chocolate o un producto similar al chocolate que comprende la composición de triglicéridos.

La invención también proporciona un chocolate o un producto similar al chocolate que comprende el CBE.

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “vegetal” se

entenderá como procedente de una planta o de un organismo unicelular. Por lo tanto, el aceite vegetal o los triglicéridos vegetales se seguirán entendiendo como aceite vegetal o triglicérido vegetal si todos los ácidos grasos utilizados para obtener dicho triglicérido o aceite son de origen vegetal o de un organismo unicelular.

El término “aceite” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a grasas y aceites de glicéridos que contienen grupos acilo de ácidos grasos y no implica ningún punto de fusión en particular. El término “grasa” se utiliza como sinónimo de “aceite” en el presente documento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “aceites derivados de los mismos” abarca cualquier aceite procesado, es decir, aceites que han sido sometidos a un proceso. Por ejemplo, este término incluye cualquier fracción de aceites, es decir, aceites que han sido sometidos a fraccionamiento.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “ácido graso” abarca los ácidos grasos libres y los residuos de ácidos grasos en triglicéridos.

El uso de la nomenclatura CX significa que el ácido graso comprende X átomos de carbono, por ejemplo, un ácido graso C16 tiene 16 átomos de carbono mientras que un ácido graso C18 tiene 18 átomos de carbono.

El uso de la nomenclatura CX:Y significa que el ácido graso comprende X átomos de carbono y Y enlaces dobles, por ejemplo, un ácido graso C16:0 tiene 16 átomos de carbono y 0 enlaces dobles, mientras que un ácido graso C18:1 tiene 18 átomos de carbono y 1 enlace doble.

Tal como se utilizan en el presente documento, las abreviaturas “SOS” y “SSO” abarcan triglicéridos (TAG), donde S denota los ésteres de ácidos grasos saturados (FAE) palmitato (C16:0) o estearato (C18:0), y O el oleato

insaturado (C18:1). Por lo tanto, “SOS” denota triglicéridos monoinsaturados con un O en la posición *sn*-2 y un S (ya sea un residuo de ácido esteárico o ácido palmítico) en cada una de las posiciones *sn*-1 y *sn*-3. “SSO” denota triglicéridos monoinsaturados asimétricos con un O en la posición *sn*-1 o *sn*-3, un S en la posición *sn*-2 y un S en la posición *sn*-1 o *sn*-3.

Los equivalentes de manteca de cacao son bien conocidos en la técnica como grasas comestibles, típicamente compuestas de una o más grasas vegetales, que tienen una composición y propiedades que son similares a la manteca de cacao, y que son compatibles con la manteca de cacao y que no tienen un efecto significativo en el comportamiento de un chocolate en el que se usan.

Como se usa en este documento, “%” o “porcentaje” se refiere al porcentaje en peso, es decir, % en peso o peso-% si no se indica nada más.

Como se usa en este documento, la expresión “actividad del agua” se define como la presión de vapor parcial del agua en el aceite dividida por la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. En equilibrio, la actividad del agua es igual a la humedad relativa. Un método simple y comúnmente usado para ajustar la actividad del agua es el preequilibrio con soluciones de sal saturadas a través de la fase de vapor en contenedores sellados (R.H. Valivety, P. J. Halling, A.R. Macrae, *Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents*, Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol. (1992) and H.L. Goderis, G. Ampe, Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol. (1992) y H.L. Goderis, G. Ampe, M.P. Feyten, B.L. Fouwé, W.M. Guffens, S.M. Van Cauwenbergh, P.P. Tobback, M.P. Feyten, B.L. Fouwé, W.M. Guffens, S.M. Van Cauwenbergh, P.P. Tobback, *Lipase-catalyzed ester exchange reactions in organic media with controlled humidity*, Biotechnol. Bioeng., Biotechnol. Bioeng. 30 (1987) 258–266). Otro método es rociar el sustrato con aire seco o húmedo o gas nitrógeno para eliminar

o suministrar agua (K. Won, Sun Bok Lee, *Computer-aided control of water activity for lipase-catalyzed esterification in solvent-free systems*, Biotechnol. Prog. 17 (2001) 258–264 y A.E.V. Petersson, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, *A water activity control system for enzymatic reaction in organic media*, Biotechnol. Bioeng. 97 (2007) 235–241).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “entorno de reacción” es el entorno en el que tiene lugar la transesterificación enzimática y comprende la lipasa específica de *sn*-1,3 inmovilizada sobre un soporte, agua, los reactivos, es decir, el aceite vegetal y el éster de alcohol alifático de ácido esteárico, ácido palmítico o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con ácido esteárico y/o ácido palmítico.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “alimentación” se define como la suma entrante en peso de sustratos para la lipasa específica de *sn*-1,3, es decir, la suma del peso del aceite vegetal (ii) y el éster de alcohol alifático de ácido esteárico, ácido palmítico o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con ácido esteárico y/o ácido palmítico (iii).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión “proporción de sustrato” es la relación en peso del éster de alcohol alifático de ácido esteárico, ácido palmítico o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con ácido esteárico y/o ácido palmítico (iii) con el aceite vegetal (ii).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra diagramas de proceso para tres modalidades diferentes del proceso de la invención.

La Figura 1A muestra un proceso en el que los ésteres de ácidos grasos (FAE) y los ácidos grasos libres (FFA) que se separan de la fase de

triglicéridos después de la reacción de transesterificación enzimática se recirculan al entorno de reacción.

La Figura 1B muestra un proceso en el que los ésteres de ácidos grasos (FAE) y los ácidos grasos libres (FFA) que se separan de la fase de triglicéridos después de la reacción de transesterificación enzimática se hidrogenan antes de recircularse al entorno de reacción.

La Figura 1C muestra un proceso en el que los ésteres de ácidos grasos (FAE) y los ácidos grasos libres (FFA) que se separan de la fase de triglicéridos después de la reacción de transesterificación enzimática se separan en una primera fracción que comprende éster de estearato y/o palmitato, y opcionalmente ácido esteárico y/o ácido palmítico y una segunda fracción que comprende éster de oleato y opcionalmente ácido oleico. La primera fracción se recircula al entorno de reacción y la segunda fracción se hidrogena antes de recircularse también al entorno de reacción.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Al describir las modalidades a continuación, la presente invención contempla todas las posibles combinaciones y permutaciones de las modalidades descritas a continuación con los aspectos divulgados anteriormente.

La invención se refiere a un proceso para aumentar el contenido de triglicéridos SOS de un aceite vegetal, en donde S representa residuos de ácido esteárico (C18:0) y ácido palmítico (C16:0) y O representa residuos de ácido oleico (C18:1), comprendiendo dicho proceso:

- a) proporcionar un entorno de reacción que comprende:
 - i) una lipasa específica de *sn*-1,3 inmovilizada sobre un soporte,
 - ii) un aceite vegetal, en donde el aceite vegetal comprende por lo menos un 45% de residuos de ácido graso de ácido oleico, basado en los residuos de ácido graso C6-C24 totales, y en

donde el aceite vegetal tiene un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 de por lo menos un 75 % en peso de los residuos de ácido graso *sn*-2 totales del aceite vegetal,

iii) un éster de alcohol alifático de ácido esteárico, ácido palmítico o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con ácido esteárico y/o ácido palmítico, y

iv) agua;

en donde la relación de peso del éster de alcohol alifático y opcionalmente ácido esteárico y/o ácido palmítico (iii) al aceite vegetal (ii) es por lo menos 4:1; y

en donde la actividad del agua del entorno de reacción está en el rango de 0.1 a 0.6;

b) calentar el entorno de reacción a una temperatura de 30-60 °C para realizar la transesterificación, obteniendo así una mezcla que comprende una fase de triglicéridos, ésteres de ácidos grasos y opcionalmente ácidos grasos libres; y

c) separar los ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos libres de la mezcla obtenida en la etapa (b) para obtener una composición de triglicéridos.

La fase de triglicéridos de la mezcla obtenida en la etapa (b) puede tener un contenido de triglicéridos SOS de por lo menos 65% en peso de la fase de triglicéridos y una relación de peso de triglicéridos SOS a triglicéridos SSO de por lo menos 80:1. El contenido de SSO de la fase de triglicéridos puede ser ≤ 1.2 % en peso de la fase de triglicéridos. El contenido de SSS de la fase de triglicéridos puede ser ≤ 4 % en peso de la fase de triglicéridos, preferentemente ≤ 3 % en peso de la fase de triglicéridos, más preferentemente ≤ 2 % en peso de la fase de triglicéridos y lo más preferentemente ≤ 1.5 % en peso de la fase de triglicéridos. Por lo tanto, la composición se puede utilizar como un equivalente de manteca de cacao, o un componente de la misma, sin la necesidad de un fraccionamiento adicional de la fase de triglicéridos.

El contenido de triglicéridos SOS, triglicéridos SSO y triglicéridos SSS de la fase de triglicéridos se puede determinar utilizando un método de HPLC de fase inversa no acuoso. Un método adecuado se describe en “Non-aqueous reversed phase liquid chromatography with charged aerosol detection for quantitative lipid analysis with improved accuracy”, Causevic, A. et al., Journal of Chromatography A, Vol. 1652, 2021, páginas 1-11.

El entorno de reacción para la transesterificación enzimática comprende una lipasa específica de *sn*-1,3 inmovilizada sobre un soporte. Esta enzima efectúa la transesterificación en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 del aceite vegetal, reemplazando así los residuos de ácidos grasos en estas posiciones en el aceite vegetal con residuos de ácido esteárico y palmítico de los ésteres de alcohol alifático de ácido esteárico o ácido palmítico y los ácidos grasos libres opcionales. En una o más modalidades, la lipasa específica de *sn*-1,3 (i) es una lipasa microbiana, por ejemplo, una lipasa bacteriana o fúngica. Preferentemente, la lipasa específica de *sn*-1,3 se deriva de una especie fúngica, especialmente las especies *Rhizopus oryzae*, *Thermomyces lanuginosus* o *Rhizomucor miehei*. Se ha descubierto que las lipasas derivadas de estas especies son particularmente adecuadas para el proceso de transesterificación de la invención en términos de especificidad, velocidad de reacción y robustez.

La inmovilización de enzimas sobre soportes es bien conocida en la técnica, y las lipasas específicas de *sn*-1,3 inmovilizadas están disponibles comercialmente de varios proveedores. Se ha descubierto que la inmovilización de lipasas específicas de *sn*-1,3 sobre materiales de soporte mejora el rendimiento de las enzimas, proporcionando así niveles más altos de triglicéridos SOS. Se conoce una variedad de materiales de soporte, como varios polímeros y sílice. En una modalidad de la invención, el material de soporte sobre el que se inmoviliza la lipasa específica de *sn*-1,3 es hidrófobo. Una enzima particularmente útil es la Lipasa DF “Amano” IM inmovilizada de *Rhizopus oryzae* (disponible en Amano Enzyme).

El aceite vegetal (ii) utilizado en el proceso de la invención debe tener una composición de ácidos grasos con un nivel relativamente alto de ácido oleico. La composición de ácidos grasos de un aceite o grasa se puede determinar mediante un análisis cromatográfico de gases de los derivados de éster metílico, preparados mediante transesterificación. La técnica de cromatografía de gas-líquido (GLC), también conocida como cromatografía de gases (GC), es una forma de cromatografía de partición en la que la fase móvil es un gas y la fase estacionaria es un líquido. La muestra se volatiliza durante la inyección y se forma un equilibrio entre la fase gaseosa y la fase líquida, que se fija en la pared interna de la columna. Cuando la muestra contiene diferentes componentes, estos se difunden en la fase líquida en distintos grados según su constante de equilibrio individual, y así viajan por la columna a diferentes velocidades. Esto da como resultado diferentes tiempos de retención y, por lo tanto, una separación física. Los componentes separados emergen del final de la columna mostrando picos de concentración, idealmente con una distribución gaussiana. Estos picos son detectados por el Detector de Ionización de Llama (FID), que convierte la concentración del componente en la fase gaseosa en una señal eléctrica, que se amplifica y se transmite a un registrador continuo, de modo que se puede monitorear y cuantificar el progreso de la separación. Un método adecuado es el método IUPAC 2.304.

El aceite vegetal (ii) que se utiliza como reactivo para la transesterificación debe comprender por lo menos un 45 % de residuos de ácidos grasos de ácido oleico (C18:1), en base a los residuos de ácidos grasos C6-C24 totales del aceite vegetal que se proporciona en el entorno de reacción. Preferentemente, el aceite vegetal comprende por lo menos un 50 % de residuos de ácidos grasos de ácido oleico (C18:1), más preferentemente por lo menos un 60 % de residuos de ácidos grasos de ácido oleico (C18:1) y, lo más preferentemente, por lo menos un 70 % de residuos de ácidos grasos de ácido oleico (C18:1). Una característica ventajosa de la invención es que los aceites vegetales que tienen un alto nivel de ácido oleico no solo en la posición *sn*-2, sino también en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3, se pueden

utilizar para proporcionar equivalentes de manteca de cacao y componentes de los mismos.

Dado que el proceso de la invención implica el uso de una lipasa específica de *sn*-1,3, para proporcionar una composición que tenga un alto nivel de SOS es necesario que el aceite vegetal ya tenga un alto nivel de residuos de ácido oleico en la posición *sn*-2. Por consiguiente, el aceite vegetal debe tener un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 de por lo menos el 75 % en peso del total de residuos de ácidos grasos *sn*-2 del aceite vegetal proporcionado en el entorno de reacción. Preferentemente, el aceite vegetal tiene un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 de por lo menos el 80 %, más preferentemente por lo menos el 85 %, incluso más preferentemente por lo menos el 90 % y lo más preferentemente por lo menos el 95 % en peso del total de residuos de ácidos grasos *sn*-2 del aceite vegetal proporcionado en el entorno de reacción.

El contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 de un aceite vegetal se puede determinar mediante un método que implica la escisión de los ácidos grasos en las posiciones *sn*-1 y *sn*-3 utilizando una enzima lipasa pancreática seguida del aislamiento de los monoacilglicéridos *sn*-2 (MAG) resultantes mediante TLC o NPLC y finalmente el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos mediante cromatografía de gases. Un método adecuado es el Método Oficial IUPAC 2.210: "Determination of fatty acids in the 2-position in the triglycerides of oils and fats", séptima edición, Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, Blackwell, Oxford, 1992.

En una o más modalidades, el aceite vegetal (ii) se selecciona de entre aceite de colza/canola con alto contenido de ácido oleico, aceite de oliva, aceite de soya con alto contenido de ácido oleico, aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico, aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, aceite de karité o aceite de colza, y/o fracciones o combinaciones de los mismos. Preferentemente, el aceite vegetal (ii) se selecciona de entre

aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico, aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico y/o combinaciones o fracciones de los mismos. Estos aceites son particularmente adecuados, porque tienen un alto contenido de ácido oleico y un costo relativamente bajo.

El entorno de reacción comprende además una fuente de residuos de ácido esteárico y/o ácido palmítico, que es un éster alcohólico alifático de ácido esteárico, ácido palmítico o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con ácido esteárico y/o ácido palmítico. El uso de ésteres alcohólicos alifáticos de ácido esteárico y palmítico es ventajoso, porque estos ésteres tienen puntos de fusión más bajos que los ácidos grasos correspondientes. Esto permite utilizar temperaturas más bajas, lo que mejora la estabilidad de la enzima, al tiempo que evita la cristalización no deseada durante el procesamiento. Preferentemente, el éster alcohólico alifático de ácido esteárico o ácido palmítico es un éster alquílico de ácido esteárico o éster palmítico o una mezcla de los mismos, más preferentemente un éster alquílico C_1 - C_4 de ácido esteárico o ácido palmítico o una mezcla de los mismos. Incluso más preferentemente, el éster se selecciona del grupo que consiste en estearato de metilo, estearato de etilo, palmitato de metilo, palmitato de etilo y mezclas de los mismos. Lo más preferente que es el éster se seleccione del grupo que consiste en estearato de metilo, estearato de etilo y mezclas de los mismos.

Se prefieren los ésteres de estearato, porque los triglicéridos SOS en los que S representa residuos de ácido esteárico no se pueden obtener en grandes cantidades a partir de aceites vegetales ampliamente disponibles, como el aceite de palma. El éster de alcohol alifático de ácido esteárico o ácido palmítico se puede utilizar en mezcla con ácido esteárico y/o ácido palmítico como ácidos grasos libres. Sin embargo, preferentemente, no se utilizan estos ácidos grasos libres.

El entorno de reacción también comprende agua. La presencia de agua es necesaria para proporcionar suficiente actividad enzimática para que se

obtingan altos niveles de triglicéridos SOS. Sin embargo, cuando el nivel de agua es demasiado alto, se ha descubierto que los diacilglicéridos y los triglicéridos SSO se forman en mayores cantidades en la fase de triglicéridos que se obtiene en la etapa (b) del proceso. Se ha descubierto que, para proporcionar un alto nivel de triglicéridos SOS y un bajo nivel de diacilglicéridos y triglicéridos SSO, la actividad de agua en la etapa a) debe estar en el intervalo de 0.1 a 0.6, preferentemente de 0.2 a 0.4.

El proceso de la presente invención utiliza una proporción particularmente alta de éster de alcohol alifático y ácido esteárico y/o ácido palmítico opcionales (iii) con respecto al aceite vegetal (ii). Se ha descubierto que una proporción alta de sustrato de por lo menos 4:1 da como resultado una mayor incorporación de ácido esteárico y ácido palmítico en las posiciones sn-1 y sn-3 del triglicérido y, por lo tanto, la producción de más triglicéridos SOS. Sorprendentemente, la proporción alta de sustrato, cuando se combina con las otras condiciones de reacción del proceso de la invención, no aumenta la producción de triglicéridos SSO y SSS a un nivel inaceptablemente alto. En consecuencia, las composiciones de triglicéridos que se producen mediante el proceso de la invención se pueden utilizar como equivalentes de manteca de cacao, o componentes de la misma, sin la necesidad de etapas de fraccionamiento adicionales para separar los triglicéridos SOS de los triglicéridos SSO y SSS. Preferentemente, la relación de sustrato es por lo menos 5:1, más preferentemente por lo menos 6:1, e incluso más preferentemente por lo menos 7:1. También se contemplan relaciones de sustrato incluso más altas dentro de la presente invención, como por lo menos 8:1 o por lo menos 9:1. Con relaciones de sustrato muy altas, la eficiencia del proceso se puede reducir por la necesidad de eliminar grandes cantidades de ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos libres en la etapa (c). En consecuencia, la relación de sustrato es típicamente como máximo 15:1, o como máximo 12:1, o como máximo 10:1.

La relación de sustrato que se utiliza en un proceso particular puede variar

dependiendo de la naturaleza del aceite vegetal (ii). Por ejemplo, cuando el aceite vegetal tiene un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 que es particularmente alto, se puede lograr un alto nivel de triglicéridos SOS mediante transesterificación incluso cuando se utiliza una relación de sustrato que se encuentra cerca del extremo inferior del rango especificado. En tales casos, el uso de relaciones de sustrato cerca del extremo inferior del rango especificado puede ser ventajoso por razones de eficiencia del proceso. Por consiguiente, en una modalidad, el aceite vegetal tiene un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 de por lo menos el 90 % o por lo menos el 95 % en peso de los residuos de ácidos grasos *sn*-2 totales del aceite vegetal y la relación en peso del éster de alcohol alifático y ácido esteárico y/o ácido palmítico opcionales (iii) con respecto al aceite vegetal (ii) está en el rango de 4:1 a 7:1. Por el contrario, si el aceite vegetal tiene un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 que es menor, entonces se puede utilizar una relación de sustrato más alta para maximizar el nivel de triglicéridos SOS en el producto de reacción. Por consiguiente, en otra modalidad, el aceite vegetal tiene un contenido de ácido oleico en la posición *sn*-2 en el intervalo de 75 % a 90 %, o en el intervalo de 75 % a 85 % en peso de los residuos de ácidos grasos *sn*-2 totales del aceite vegetal y la relación de peso del éster de alcohol alifático y ácido esteárico y/o ácido palmítico opcionales (iii) con respecto al aceite vegetal (ii) es por lo menos 7:1. Por lo tanto, la relación de sustrato se puede variar, dependiendo del contenido de triglicéridos del aceite vegetal que se utiliza y la composición del producto que se desea.

En todas las modalidades, la temperatura a la que se calienta el entorno de reacción está en el intervalo de 30-60 °C. Preferentemente, la temperatura está en el intervalo de 35-45 °C. La temperatura del entorno de reacción se elige de forma que sea lo suficientemente alta para proporcionar una buena actividad enzimática y, por lo tanto, un alto nivel de triglicéridos SOS, al mismo tiempo que sea lo suficientemente baja para minimizar la producción de subproductos indeseables, como los triglicéridos SSO y SSS. El uso de bajas temperaturas de reacción promueve la estabilidad de las enzimas y

es posible gracias al uso de ésteres de alcohol alifático, que generalmente tienen puntos de fusión bajos.

El proceso de la invención se puede llevar a cabo como un proceso discontinuo, un proceso alimentado por lotes o un proceso continuo.

En un proceso discontinuo, los componentes (i)-(iv) se mezclan en un reactor durante un cierto tiempo de reacción hasta que se produce el rendimiento deseado de producto y las enzimas se filtran.

En un proceso alimentado por lotes, el sustrato se añade al reactor por lotes no de una sola vez, sino poco a poco.

En un proceso continuo, las enzimas se fijan en un reactor de lecho fijo, el sustrato se bombea a través del reactor y se extrae una corriente de producto del reactor. En un proceso continuo, el caudal de la alimentación (es decir, la suma del peso del aceite vegetal (ii) y el éster de alcohol alifático de ácido esteárico, ácido palmítico o mezclas de los mismos, opcionalmente mezclado con ácido esteárico y/o ácido palmítico (iii)) a través del reactor está preferentemente en el intervalo de 0.5 a 14, más preferentemente de 2 a 10, y lo más preferentemente de 4 a 8 g de alimentación/g de enzima/h. Se ha descubierto que los procesos continuos son ventajosos para un reciclado más simple de ésteres de ácidos grasos y ácidos grasos y una migración reducida de grupos acilo dentro de los triglicéridos. En modalidades ventajosas de la invención, los ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos libres que permanecen en la mezcla de reacción después de la transesterificación se procesan opcionalmente y se recirculan al entorno de reacción.

En una modalidad, el proceso comprende además una etapa (d1) que comprende la recirculación de ésteres de ácidos grasos y, cuando están presentes, ácidos grasos libres separados en la etapa (c) al entorno de reacción. De esta manera, se puede lograr una reacción más eficiente y

aumentar la proporción de sustrato sin el costo de proporcionar reactivos adicionales. Este proceso se representa esquemáticamente en la Figura 1A.

En una modalidad alternativa, en la que el éster de alcohol alifático (iii) comprende un éster de alcohol alifático de ácido esteárico opcionalmente mezclado con ácido esteárico, el proceso comprende además una etapa (d2) que comprende hidrogenar ésteres de ácidos grasos y, cuando estén presentes, ácidos grasos libres separados en la etapa (c) y recircular los ésteres de ácidos grasos hidrogenados y los ácidos grasos libres al entorno de reacción. En esta modalidad, el ácido oleico libre y los ésteres de ácido oleico, que se encuentran entre los componentes separados en la etapa (c), se pueden convertir en ácido esteárico y sus ésteres para complementar aún más los ésteres de alcohol alifático de ácido esteárico y el ácido esteárico opcional en el entorno de reacción. Esta modalidad se representa esquemáticamente en la Figura 1B.

En una modalidad alternativa adicional, el proceso comprende además una etapa (d3) que comprende separar ésteres de ácidos grasos y, cuando estén presentes, ácidos grasos libres separados en la etapa (c) en una primera fracción que comprende éster de estearato y/o palmitato, y opcionalmente ácido esteárico y/o ácido palmítico, y una segunda fracción que comprende éster de oleato y opcionalmente ácido oleico, y recircular la primera fracción al entorno de reacción. Opcionalmente, en esta modalidad, la segunda fracción puede hidrogenarse para proporcionar éster de ácido esteárico y opcionalmente ácido esteárico y recircularse al entorno de reacción. Esta modalidad se representa esquemáticamente en la Figura 1C.

En una modalidad, los ésteres de ácidos grasos y los ácidos grasos libres separados, es decir, los ésteres de ácidos grasos y opcionalmente los ácidos grasos libres separados en la etapa (c), o los ésteres de ácidos grasos hidrogenados y los ácidos grasos libres proporcionados en la etapa (d2), o la primera fracción proporcionada en la etapa (d3), o la segunda

fracción proporcionada en la etapa (d3) (ya sea antes o después de la hidrogenación), se blanquean antes de recircularlos al entorno de reacción. El blanqueo elimina las impurezas y asegura una mejor vida útil enzimática y, por lo tanto, una transesterificación más eficiente.

Como se mencionó anteriormente, una ventaja del proceso de la invención es que la composición de triglicéridos que se produce tiene un nivel suficientemente alto de triglicéridos SOS y un nivel suficientemente bajo de triglicéridos SSO y SSS para usarse como un equivalente de manteca de cacao, o un componente de la misma, sin la necesidad de una etapa de fraccionamiento adicional. En consecuencia, en una modalidad preferida, la composición de triglicéridos obtenida en la etapa (c) no se somete a una etapa de fraccionamiento para proporcionar una composición de triglicéridos fraccionada que tenga un contenido adicional aumentado de triglicéridos SOS.

El proceso también puede comprender además el uso de la composición de triglicéridos obtenida en la etapa (c) como un equivalente de manteca de cacao o un componente de la misma en la fabricación de un chocolate o un producto similar al chocolate. En una modalidad especialmente preferida, la composición de triglicéridos obtenida en la etapa (c) no se somete a una etapa de fraccionamiento para proporcionar una composición de triglicéridos fraccionada que tenga un contenido adicional aumentado de triglicéridos SOS, y la composición de triglicéridos se utiliza como un equivalente de manteca de cacao o un componente de la misma en la fabricación de un chocolate o un producto similar al chocolate.

La invención también proporciona una composición de triglicéridos que se puede obtener mediante el proceso de la invención. La composición de triglicéridos se puede utilizar como un componente de un equivalente de manteca de cacao, normalmente en una cantidad de 10-70 % en peso. En consecuencia, la invención también proporciona un equivalente de manteca de cacao que comprende entre el 10 y el 70 % en peso de la composición

de triglicéridos. La invención también proporciona chocolate o productos similares al chocolate que comprenden la composición de triglicéridos.

Ejemplos

En las modalidades en las que se desea determinar los isómeros posicionales individuales, por ejemplo, las cantidades de SOS, SSO y SSS en la fase de triglicéridos, se utilizó un método de HPLC de fase inversa no acuosa (Causevic, A. et al. *“Non-aqueous reversed phase liquid chromatography with charged aerosol detection for quantitative lipid analysis with improved accuracy”*, Journal of Chromatography A, vol. 1652, 2021, páginas 1-11). El método también se utilizó para separar y cuantificar diferentes ácidos grasos libres, ésteres de ácidos grasos, monoacilglicéridos, diacilglicéridos y triacilglicéridos.

Ejemplo 1:

La transesterificación enzimática se realizó en una configuración de proceso continuo para producir SOS a partir de una alimentación que contenía aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico (HOSFO) y estearato de metilo (Me-St). Se utilizaron columnas rellenas con 15 g de lipasa DF “Amano” IM inmovilizada de *Rhizopus oryzae* (Enzima Amano), junto con las condiciones de reacción descritas en la siguiente tabla. El caudal se controló mediante una bomba de engranajes, que bombeaba el aceite desde los tanques a través de las columnas enzimáticas. La temperatura se controló y fijó mediante un calentador, que calentaba el baño de agua donde se colocaron los tanques de sustrato, las conexiones y las columnas enzimáticas.

Experimento No.	Relación de sustrato (Me-St/HOSFO)	Actividad del agua	Temperatura (°C)	Caudal (g aceite/g enzima/h)	SOS % en fase de triglicéridos	SSO % en fase de triglicéridos	Relación SOS/SSO
1	9.0	0.24	50.0	6.9	81.2	0.6	140
2	5.0	0.24	45.0	9.1	72.7	0.4	184
3	7.0	0.24	45.0	9.1	78.5	0.5	138
4	9.0	0.24	45.0	9.0	81.5	0.7	116
5	5.0	0.24	50.0	8.9	73.8	0.4	184
6	2.0	0.24	50.0	7.4	41.4	0.3	125
7	3.0	0.24	50.0	9.1	46.1	0.2	255
8	4.0	0.7	70.0	9.2	61.8	2.2	28

S = C18:0 y C16:0, O=C18:1

De estos resultados se desprende que, utilizando una alta relación de sustrato junto con las demás condiciones de proceso de la invención, se puede producir un producto de alta calidad, con un alto contenido de SOS y una alta relación de SOS/SSO. Por el contrario, cuando la relación de sustrato es baja, como en los Experimentos 6 y 7, no se consigue un contenido de SOS superior al 65 %. Además, en los Experimentos 1-5, el contenido de SSO de la fase de triglicéridos permanece suficientemente bajo, de modo que la relación SOS/SSO es aceptable. Por el contrario, cuando la temperatura y la actividad del agua son altas, como en el Experimento 8, se producen triglicéridos SSO en una mayor cantidad, lo que da como resultado una baja relación SOS/SSO.