



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 290 912 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27.10.1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 11 B 1/00
C 12 N 9/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 11 B / 332 375 0	(22)	05.09.89	(44)	13.06.91
(71)	Akademie der Wissenschaften, Otto-Nuschke-Straße 22/23, O - 1080 Berlin, DE				
(72)	Mieth, Gerhard, Dr. rer. nat.; Marek, Elke, Dr. rer. nat.; Schalinatus, Edith, Dr. rer. nat.; Weigelt, Ellen, Dipl.-Chem.; Ullmann, Irene, Dr. rer. nat.; Behnke, Ulrich, Dr. rer. nat.; Kerns, Gerhard, Dr. rer. nat.; Kude, Jelena, Dr. rer. nat.; Große, Marion, Dipl.-Chem., DE				
(73)	Akademie der Wissenschaften, Zentralinstitut für Ernährung, O - 1505 Rehbrücke; Akademie der Wissenschaften, Institut für Biotechnologie, O - 7010 Leipzig, DE				
(74)	Zentralinstitut für Ernährung, Patentbüro, Arthur-Scheunert-Allee 114/116, O - 1505 Bergholz-Rehbrücke, DE				
(54)	Verfahren zur Gewinnung von Ölen und Fetten				

(55) Ölgewinnung; pflanzliche Öle und Fette; enzymatische Behandlung; Cerealienkeimöl; Lipidfreisetzung
(57) Das erfindungsgemäße Verfahren zur Gewinnung von Ölen oder Fetten aus pflanzlichen Rohstoffen, insbesondere aus Cerealienkeimen, beruht im wesentlichen darauf, daß die eingesetzten Rohstoffe einer enzymatischen Behandlung mit Cellulase- und Proteasekomplexen unterworfen werden. Unter Freisetzung von Lipiden erfolgt ein Aufschluß. Aus der resultierenden, gegebenenfalls getrockneten Maische werden die Öle oder Fette durch Direkt- oder Verdrängungsextraktion abgetrennt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Gewinnung von Ölen und Fetten aus pflanzlichen Rohstoffen, vorzugsweise aus Cerealienkeimen, für die Humanernährung unter enzymatischer Einwirkung auf die Rohstoffe sowie Extraktion oder Verdrängungsbehandlung der Einwirkungsprodukte, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Rohstoffe gegebenenfalls mit Enzymkomplexen von Pilzen, vorzugsweise aus *Aspergillus terreus*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium verruculosum* und/oder *Penicillium janthinellum*, gegebenenfalls auch in Kombination mit Proteasekomplexen, vorzugsweise von *Thermoactinomyces vulgaris*, *Bacillus subtilis* oder *Aspergillus niger* inkubiert werden, und die resultierende Maische, gegebenenfalls nach Trocknung, durch Direkt- oder Verdrängungsextraktion entfettet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß Cellulasekomplexe mit hoher Aktivität an Endoglucanasen, β -Glucosidasen und Cellobiohydrolasen sowie Nebenaktivitäten an Hemicellulasen, anderen Glucanasen, Pektinasen, Amylasen und Proteasen sowie Proteasekomplexe mit hoher Endopeptidaseaktivität eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Inkubation bei Gesamtzymkonzentrationen von 0,1 bis 3,0 Ma.-%, vorzugsweise 0,5 bis 1,0 Ma.-%, Feststoff-Flüssigkeitsverhältnissen von 1 zu 0,2 bis 1 zu 5, vorzugsweise 1 zu 1 bis 1 zu 3, pH-Werten von 4,0 bis 8,0, vorzugsweise 5,0 bis 6,0, Temperaturen von 40 bis 60°C, vorzugsweise 45 bis 55°C, und Zeiten von 8 bis 24 h, vorzugsweise 12 bis 16 h, vorgenommen wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Inkubation mit cellulolytischen und proteolytischen Enzymkomplexen simultan oder sukzessiv unter gleichen oder den jeweiligen Enzymwirkungsbedingungen angepaßt erfolgt.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Entfettung der feuchten Maische, gegebenenfalls nach thermischer Behandlung, vorzugsweise Uperisation, durch Verdrängungsextraktion mittels wäßriger oder alkoholischer Medien, vorzugsweise 5%ige Kochsalzlösung oder Isopropanol, und separative Abscheidung der Lipide durchgeführt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 4 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Entfettung der getrockneten Maische, gegebenenfalls nach thermischer Behandlung, vorzugsweise Extrusion, durch Perkulations- oder Immissionsextraktion mittels nichtwäßriger oder wäßrig-organischer Lösungsmittel oder ihrer Gemische, vorzugsweise Hexan, Hexan-Isopropanol im Volumenverhältnis 3 zu 2 oder Hexan-Ethanol im Volumenverhältnis 3 zu 1 und destillative Abscheidung der Lipide durchgeführt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein biotechnologisches Verfahren zur Gewinnung von Ölen und Fetten aus pflanzlichen Rohstoffen, vorzugsweise Cerealienkeimen, für die Humanernährung.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die großtechnische Gewinnung von Ölen pflanzlicher Spezies und von solchen Fetten erfolgt derzeit durch Pressung (Vor- oder Fertigpressung) und/oder Extraktion mit organischen Lösungsmitteln (Direkt- oder Nachextraktion). Kleintechnische Verfahren basieren daneben auch auf einer Verdrängung von Ölen oder Fetten durch wäßrige oder nichtwäßrige Medien. Der eigentliche Entfettung geht in der Regel eine spezifische Vorbehandlung der Rohstoffe (Aufbereitung) voraus, die bei traditionellen Verfahren meist eine Reinigung, Trocknung, Schälung, Zerkleinerung, Flockulierung und Konditionierung umfaßt. Bei unkonventionellen Verfahren beschränkt sich dergegenüber die Aufbereitung im allgemeinen auf eine Schälung, wobei die Entfettung mit einer mechanischen Naß- oder Trockenfeinstzerkleinerung gekoppelt wird. Schälung, Zerkleinerung und Konditionierung erweisen sich bei allen Verfahren der Entfettung hinsichtlich Ausbeute und Qualität der Finalprodukte als kritische Prozeßstufen. Bei Verdrängungsverfahren stellen sich außerdem erhebliche technische Probleme beim mechanischen Zellaufschluß, der separativen Phasentrennung und der thermischen Brechung der als Zwischenprodukt anfallenden mehr oder weniger stabilen Fettemulsionen. Im neueren Schrifttum finden sich begrenzt Angaben zur biotechnologischen Aufbereitung fettreicher Rohstoffe, insbesondere von Oliven- und Kokosfrüchten, aber auch Ölsamen und Cerealienkeime zwecks Ölgewinnung. Deren Prinzip besteht in einem cellulolytischen Zellwandabbau unter Freisetzung von Lipiden und deren Gewinnung durch Separation oder Extraktion. Als dafür geeignete Enzyme werden insbesondere Cellulasen, Pektinasen und Hemicellulasen beschrieben. Der Hauptnachteil dieser enzymatischen Aufbereitungsverfahren besteht vor allem in einer u. a. von Inhibitorstatus und morphologischen Besonderheiten der Rohstoffe geprägten hohen Substratabhängigkeit der Effektivität der verwendeten, hinsichtlich ihrer Wirkungsspezifität nicht näher charakterisierten Enzympräparate.

Die Reproduzierbarkeit biotechnologischer Verfahren der Entfettung ist demzufolge weder bezüglich der Ausbeute, noch der Qualität der anfallenden Öle oder Fette gesichert.
Ein spezieller Nachteil bei nachgeschalteten Verdrängungsverfahren liegt weiterhin in dem energetischen Mehraufwand für eine erforderliche Emulsionsbrechung, und bei angekoppelten Extraktionsverfahren erweist sich der notwendige Einsatz polarer organischer Lösungsmittelsysteme als ökonomisches Handicap.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht daher in der Entwicklung eines universell anwendbaren biotechnologischen Verfahrens der Öl- oder Fettgewinnung aus fettreichen pflanzlichen Rohstoffen unter Gewährleistung energiearmer und inhaltsstoffschonender Grundoperationen der Aufbereitung und Entfettung.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Multienzymkomplexe und spezifische Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, die eine weitgehende Freisetzung von Lipiden unter Hintanhaltung der Bildung stabiler Emulsionen sowie lipolytischer und lipoxydativer Veränderungen ermöglichen.

Erfindungsgemäß werden Öle oder Fette aus pflanzlichen Rohstoffen, vorzugsweise Cerealienkeimen, für die Humanernährung gewonnen, indem die fettreichen Rohstoffe durch Inkubation mit Cellulasekomplexen von Pilzen, vorzugsweise *Aspergillus terreus*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium verrucosum* und/oder *Penicillium janthinellum* enzymatisch unter Freisetzung von Lipiden aufgeschlossen und nachfolgend aus der resultierenden, gegebenenfalls getrockneten Maische Öle oder Fette durch Direkt- oder Verdrängungsextraktion abgetrennt werden.

Als im Rahmen der Erfindung besonders effektive Enzymsysteme erweisen sich Cellulasekomplexe genannter Mikroorganismen mit hoher Aktivität an Endoglucanasen, β -Glucosidasen und Cellobiohydrolasen sowie Nebenaktivitäten an Hemicellulasen, anderen Glucanasen, Pektinasen, Amylasen und Proteasen (Tabelle 1).

Wie nämlich in diesem Zusammenhang gefunden wurde, setzt eine angestrebte hohe Öl- oder Fettausbeute einen nahezu vollständigen Zellwandabbau und eine weitgehende Proteolyse voraus, da andernfalls schwerlösliche Lipidanlagerungsverbindungen und/oder stabile Fett-emulsionen gebildet werden. Weiterhin wurde gefunden, daß bei bestimmten Rohstoffen, insbesondere solchen mit hoher Aktivität an Lipidasen, Lipoxygenasen und Proteaseninhibitoren, eine hydrothermische Vorbehandlung günstige Ergebnisse zeigt.

Auch wurde gefunden, daß im Falle proteinreicher oder auch an eigener Protease armer Rohstoffe eine kombinierte enzymatische Behandlung mit den genannten Cellulase- und Proteasekomplexen mit hoher Endopeptidaseaktivität, vorzugsweise von *Thermoactinomyces vulgaris*, *Bacillus subtilis* und *Aspergillus niger*, besonders vorteilhaft ist, um vertretbare Inkubationszeiten bei zugleich hohen Abbauraten zu erzielen.

Die enzymatische Behandlung der eingesetzten Rohstoffe mit den verschiedenen Enzymen kann dabei erfindungsgemäß simultan oder sukzessiv unter Anpassung der Inkubationsbedingungen an die jeweiligen Enzymwirkungsoptima hinsichtlich pH-Bereich, Temperatur und Aktivität usw. erfolgen.

Die erfindungsgemäße Arbeitsweise, z. B. hinsichtlich der Inkubation, erfordert die Einhaltung von Gesamtzykluskonzentrationen zwischen 0,1 und 3,0%, vorzugsweise 0,5 und 1,0%, Feststoff- Flüssigkeits-V verhältnissen zwischen 1 zu 0,2 und 1 zu 5, vorzugsweise 1 zu 1 und 1 zu 3, pH-Werten zwischen 4,0 und 8,0, vorzugsweise 5,0 und 6,0, Temperaturen zwischen 40 und 60°C, vorzugsweise 45 und 55°C, sowie Einwirkungszeiten zwischen 8 und 24 h, vorzugsweise 12 und 16 h.

Schließlich wurde auch gefunden, daß eine vorteilhafte erfindungsgemäße Variante zur Entfettung der anfallenden feuchten Maische darin besteht, eine Verdrängungsextraktion mittels wäßriger oder alkoholischer Medien, vorzugsweise 5%ige Kochsalzlösung oder Isopropanol, in Verbindung mit einer separativen Abscheidung der Lipide oder alternativ dazu zur Entfettung der getrockneten Maische eine Immersions- oder Perkolations-Extraktion mittels nichtwäßriger oder wäßrig-organischer Lösungsmittel oder ihrer Gemische, vorzugsweise Hexan, Hexan-Isopropanol (3/2, v/v) oder Hexan-Ethanol (3/1, v/v), in Verbindung mit einer destillativen Abscheidung der Lipide vorzunehmen. Eine thermische Behandlung der Maischen durch Upperisation oder Extrusion wirkt sich dabei besonders günstig auf die Lipidausbeute aus.

Die Erfindung wird durch nachstehende Ausführungsbeispiele erläutert:

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

1 kg feuchte Maiskeime (Rohlipide 20,4%, Rohproteine 4,4%, Wasser 63,2%) werden nach Zusatz von 3 kg einer Citratpufferlösung (pH 5,0) und 1 Ma.-% eines Cellulasekomplexes von *Aspergillus terreus* bei 50°C über 6 h fermentiert. Danach erfolgt eine pH-Regulation mittels Phosphatpuffer auf 7,5, ein Zusatz von 0,5 Ma.-% *Thermoactinomyces vulgaris* sowie eine Nachfermentation bei 50°C über 4 h. Die anfallende Maische wird im Düsenskoher 10 s auf 170°C erhitzt und nach Abkühlung auf 60°C und Zusatz von 2 kg einer 5%igen Kochsalzlösung separiert. Der Restlipidgehalt des getrockneten Rückstandes beträgt 3,9 Ma.-%.

Beispiel 2

1 kg konditionierter und flockulierter Rapssamen (Rohlipide 42,2 Ma.-%, Rohproteine 22,7 Ma.-%, Wasser 7,9 Ma.-%) wird mit 0,2 kg einer Citratpufferlösung (pH 5,0), die jeweils 1 Ma.-% eines Cellulasekomplexes von *Penicillium janthinellum* und *Trichoderma reesei* enthält, besprüht und bei 45°C über 12 h fermentiert.

Die anfallende Maische wird im Extruder 5 min auf 120°C erhitzt und nach Abkühlung auf 60°C mit 1 kg Hexan durch Perkolationsextraktion entfettet.
Der Restlipidgehalt des desolventisierten Rückstandes beträgt 2,9 Ma.-%.

Beispiel 3

1 kg geschälte und zerkleinerte Sonnenblumensamen (Rohlipide 55,6 Ma.-%, Rohproteine 21,3 Ma.-%, Wasser 5,7 Ma.-%) wird nach Zusatz von 2 kg einer Citratpufferlösung sowie jeweils 1 Ma.-% eines Cellulase- und Proteasekomplexes von *Penicillium verruculosum* oder *Aspergillus niger* bei 40°C über 24 h fermentiert.

Die anfallende Maische nach Zusatz von 2 kg Isopropanol wird separiert. Der Restlipidgehalt des Rückstandes beträgt 1,8 Ma.-%.