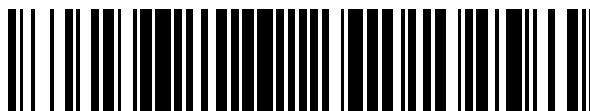


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 309**

51 Int. Cl.:

C11B 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.12.2007 PCT/EP2007/010562**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2008 WO08080495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.12.2007 E 07856386 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **11.05.2022 EP 2118247**

54 Título: **Procedimiento mejorado para la obtención de aceite a partir de semillas**

30 Prioridad:

29.12.2006 DE 102006062045

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:

29.06.2022

73 Titular/es:

**AB ENZYMES GMBH (100.0%)
Feldbergstrasse 78
64293 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:

**KÖHLER, JÖRG;
MARSCHNER, VOLKER y
WINTER, BRUNO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Procedimiento mejorado para la obtención de aceite a partir de semillas

5 La presente invención se refiere a un procedimiento mejorado para la obtención de aceite a partir de semillas utilizando enzimas. En particular, la invención se refiere a un procedimiento en el que semillas oleaginosas secas son rociadas con enzimas, sin que con ello se aumente significativamente el contenido en humedad de la semilla oleaginosa y según el cual las semillas oleaginosas pueden ser inmediatamente prensadas a continuación.

10 Semillas oleaginosas tales como habas de soja, cacahuets, semillas de algodón, semillas de girasol, gérmenes de maíz y semillas de colza (incluida canola) representan la fuente principal de aceites vegetales comestibles. Cubren más del 70% de la producción mundial de grasas y aceites de materias primas vegetales. En este caso, las habas de soja están representadas con el 20%. Estas semillas oleaginosas no son los suministradores principales de aceite, sino que también son muy buenas fuentes para proteína de gran valor, la cual se emplea a menudo también para fines de cebado de animales.

15 En los últimos años aumentó la demanda de aceites vegetales como sustitutos de combustibles fósiles. En este caso, han adquirido particular importancia el aceite de soja en Norteamérica y Sudamérica, así como el aceite de colza (especies doble cero; colza 00, en el que se han eliminado mediante cultivo el ácido erúxico y glucosinolatos) en Europa y Canadá. Las especies de colza doble cero desarrolladas en Canadá y cultivadas en todo Norteamérica se designaron originalmente por motivos de mercado como *canola* (**Canadian oil, low acid** – aceite canadiense, de bajo contenido en ácidos). Entretanto, *canola* se entiende en muchas partes de América y Australia generalmente por la designación de colza (en realidad, *Rapeseed* - semilla de colza). Ciertamente, colza canola se diferencia de “colza canadiense” de las especies 00 difundidas en Europa. Además, muchas de las especies de canola de hoy en día son transgénicas.

20 Junto a su aprovechamiento como aceite comestible y como materia prima para grasas alimenticias, la colza se planta en Alemania principalmente para la fabricación de productos técnicos. El cultivo de colza de invierno en Alemania, en la cosecha de 2004, asciende a aproximadamente 1,23 millones de hectáreas, lo cual corresponde a una cantidad de semilla de colza de aprox. 3,5 millones de toneladas. Más de la mitad del aceite vegetal producido en Alemania es entretanto aceite de colza. En todo el mundo, la cantidad cosechada de colza en 2004/5 se encontró en 46 millones de toneladas, siendo las regiones de plantación principales Europa, Canadá, Estados Unidos de América, Australia, China e India. El cultivo de colza fue según ello la semilla oleaginosa de mayor volumen después de la soja y el aceite de palma y se cultiva en aproximadamente el 13% de la superficie agraria aprovechada. La superficie de cultivo aprovechada para el cultivo de colza continúa aumentando en todo el mundo.

25 La parte principal de la colza se emplea para la producción de éster metílico de aceite de colza (RME – siglas en alemán) que también se conoce bajo el término biodiesel. Como producto de desecho se obtiene en este caso glicerol.

30 Dado que el biodiesel, especialmente de colza, en calidad de materia prima renovable presenta un balance de CO₂ más favorable que los combustibles fósiles, es biológicamente degradable y es más estable que, p. ej., el éster metílico de girasol (SME – siglas en alemán) y durante la combustión genera menos negro de carbono que el combustible diesel, su producción se fomenta intensamente de forma rentable en todo el mundo. En Europa, la cantidad producida de biodiesel en 2005 se encontraba en 4 millones de t, de las cuales el 50% se produjeron en Alemania. En todo el mundo se produjeron en 2005 aprox. 10 millones de t de biodiesel. Las cantidades de cultivo anuales de colza continúan aumentando.

35 La obtención de aceite a partir de simientes puede llevarse a cabo según diferentes procedimientos. Habitualmente, el aceite es prensado de la simiente o es extraído con disolventes orgánicos después del desmenuzamiento de la semilla. También se utilizan procedimientos de combinación en los que, después de una etapa de prensado, la porción de aceite que permanece en la torta de prensado se extrae con disolventes orgánicos. El procedimiento empleado depende fuertemente del uso ulterior de la torta de prensado. Con el fin de poder servir como pienso, no debe estar contenido disolvente orgánico alguno y el contenido en aceite residual debería ser bajo con el fin de presentar un valor energético óptimo de la torta de prensado rica en albúmina para su incorporación por mezcladura en el pienso.

40 El método de extracción tiene el inconveniente de unos elevados costes de adquisición para el equipamiento y elevados costes de explotación. Adicionalmente, los disolventes (p. ej. hexano) representan riesgos tanto en la manipulación como también desde un punto de vista sanitario de los restos contenidos en el orujo. Otro inconveniente del método de extracción estriba en que la calidad del aceite alcanzada es sólo baja. El aceite

5 contiene elevados contenidos en fosfolípidos (100 – 600 ppm de P) que deben ser eliminados antes del tratamiento
ulterior para formar aceite alimenticio o también para formar biodiesel. Los valores límites admitidos se encuentran
en la industria de aceites alimenticios por debajo de 10 ppm de P, preferiblemente por debajo de 5 ppm de P, y en
la industria de los combustibles, por debajo de 14 ppm de P, en cada caso calculado como fósforo. En la industria
de los aceites alimenticios, la reducción de los fosfolípidos sirve para aumentar la estabilidad al almacenamiento,
dado que los fosfolípidos son higroscópicos y, por consiguiente, atraen agua, lo cual conduce a enturbiamientos en
el aceite. En la industria de los combustibles, los ácidos fosfóricos liberados son agresivos durante la combustión y
conducen a un desgaste más rápido de los motores. Otro inconveniente del método de extracción para la aplicación
del aceite extraído en la industria alimenticia es la elevada densidad de color del aceite de extracción que debe ser
10 reducida a través de procesos de adsorción.

Además, se emplearon también enzimas para la disgregación de material vegetal para la mejora del rendimiento de
aceite procedente de semillas oleaginosas (véanse, p. ej., los documentos WO 1991/013956 A1 o EP 0 113 165
A1). Todos los procedimientos de este tipo se basan en las etapas a) desmenuzamiento de la semilla oleaginosa
mediante molienda o prensado, b) adición de agua y enzima, con lo que el contenido en humedad aumenta hasta
15 20% - 35% o más, c) incubación a lo largo de 6-24 h a temperatura elevada, d) separación por prensado o
separación por centrifugación del aceite o secado hasta una humedad residual inferior al 10%, y extracción del
aceite o bien de una combinación a base de prensado y extracción (véase, p. ej. Domínguez et al., 1995, Food
Chem. 54: 223-231; Domínguez et al., 1994, Food Chem. 49, 271-286). En particular, se han de señalar aquí los
trabajos de Domínguez et al., 1995 que se llevaron a cabo en soja. En ellos se remite a la importancia del elevado
20 contenido en agua en la etapa de la reacción con enzimas, así como al contenido en agua reducido para la
subsiguiente extracción.

El documento "J Am Oil Chem Soc 1993, 70 (9) 825-829" describe a modo de recopilación el uso de un tratamiento
con enzimas antes del prensado de semillas oleaginosas, así como la influencia de este tratamiento con enzimas
sobre la calidad del aceite así obtenido, así como el balance energético del procedimiento. En tal caso, el
tratamiento con enzimas tiene lugar con un contenido en humedad de 30% y a 50°C durante seis horas. La
simiente, así tratada, es secada antes del prensado hasta un contenido en humedad de 6%.

Sólo utilizando un elevado contenido en agua durante la reacción enzimático se han manifestado como eficaces en
calidad de enzimas, en función de la semilla oleaginosa, celulasas, hemicelulasas, proteasas o mezclas de enzimas
a base de celulasas, pectinasas y proteasas. El objetivo del tratamiento enzimático es el debilitamiento y la
degradación parcial de las paredes de las células (pared celular primaria y secundaria), así como la destrucción de
la envuelta de la membrana que rodea al aceite. Para lo primero es posible el empleo de celulasas, hemicelulasas y
pectinasas, para esto último lo es el empleo de proteasas para la hidrólisis de las oleosinas. El objetivo del
tratamiento enzimático es el debilitamiento de las paredes celulares y de las membranas que encierran al aceite,
35 con el fin de posibilitar una obtención simplificada.

Estos procedimientos son muy laboriosos y de gran consumo de energía, en particular con el fin de reducir el
elevado contenido en agua necesario para la reacción enzimática antes de las etapas de prensado o de extracción.
También el espacio a habilitar para la incubación es muy grande, si se establece el rendimiento medio diario de un
molino de aceite de 200 – 1000 t de aceite obtenido al día.

Por consiguiente, existe una demanda de procedimientos mejorados para la obtención de aceite a partir de semillas
en los que no aparezcan los inconvenientes que anteceden del estado conocido de la técnica.

Por consiguiente, la presente invención se basa en habilitar un procedimiento mejorado para la obtención de aceite
a partir de semillas. El procedimiento no debe presentar los inconvenientes del estado conocido de la técnica
precedente. En particular, conforme a la invención debe habilitarse un procedimiento que conduzca a elevados
rendimientos de aceite así como a un escaso contenido en fosfátidos y en humedad en el aceite. Además, el
procedimiento debe poder emplearse de manera que ahorre energía y tiempo y debe conducir a elevados
rendimientos de aceite. Además, el procedimiento debe poder ser empleado universalmente, adecuarse, por
ejemplo, tanto para la obtención de aceite, p. ej. para la generación de biodiesel, como también para la obtención
de aceite alimenticio. Además, el procedimiento debe poder manipularse de manera sencilla y económica y debe
55 poder adecuarse para una amplia pluralidad de semillas oleaginosas.

Sorprendentemente, se ha encontrado ahora que mediante el rociado de las semillas oleaginosas secas con
enzimas se puede obtener un procedimiento para la obtención de aceite a partir de semillas que va acompañado de
rendimientos incrementados de aceite, de una duración reducida del prensado y de un contenido reducido en
fosfátidos en el aceite, comparados con aceites procedentes de prensados convencionales. Además, mediante el
60

procedimiento de acuerdo con la invención no se aumenta de manera significativa el contenido en humedad de la semilla de aceite en ninguna etapa del tratamiento.

5 Por consiguiente, la invención se refiere a un procedimiento para la obtención de aceite a partir de semillas, el cual se caracteriza porque a) una disolución acuosa, que contiene una o varias enzimas celulolíticas y/o lipolíticas y/o pectinolíticas y/o proteolíticas y/o fitasa se rocía directamente sobre la simiente seca, b) la simiente, así obtenida, sin un período de incubación adicional y sin aportación adicional de agua, se aporta de manera en sí conocida, a un prensado de una o varias etapas, eventualmente acoplado con una extracción, y c) el aceite se obtiene de manera en sí conocida y, eventualmente, se continúa elaborando, aumentando el agua incorporada mediante el rociado de la disolución de enzimas el contenido natural en agua de las simientes (4-8% p/p) en aprox. 0,1 hasta como máximo 2% (p/p) referido a la masa de la simiente.

10 La invención se refiere, además, al uso de este procedimiento en la producción de aceite alimenticio y en la obtención de aceite, p. ej., para la producción de biodiesel.

15 En el caso del procedimiento de acuerdo con la invención, la disolución de enzimas se aplica directamente sobre la simiente o, en el caso de semillas oleaginosas mayores, sobre la simiente aplastada o molida, sin que con ello aumente significativamente el contenido natural en agua de la semilla oleaginosa. Sorprendentemente, se encontró que la disolución de enzimas puede ser rociada directamente sobre la simiente seca, sin que deba tener lugar incubación alguna de la simiente rociada con la enzima en agua. La simiente puede rociarse como tal o con una disolución enzimática después del desmenuzamiento. En tal caso, una disolución acuosa que contiene a la enzima elegida o bien a las enzimas elegidas, se rocía de manera en sí conocida sobre la simiente. En el caso de la disolución de enzimas acuosa se puede tratar de una disolución de enzimas obtenida de manera conocida a partir del sobrenadante del cultivo de microorganismos (p. ej. consistente en las etapas: separación de la biomasa del líquido de cultivo, concentración de la disolución obtenida mediante ultrafiltración y filtración de supresión de los gérmenes), que también puede contener agentes estabilizantes. Sin embargo, también pueden estar contenidas en la disolución enzimática enzimas vegetales tales como, p. ej. papaína. La cantidad típica de disolución de enzimas aplicada se encuentra en el orden de magnitud de 1.000 ppm, referido al peso de la semilla oleaginosa. El agua incorporada mediante el rociado de la disolución de enzimas aumenta el contenido natural en agua de las simientes (4 – 8% p/p) sólo en aprox. 0,1 hasta como máximo 2% (p/p) referido a la masa de la simiente. La simiente, así preparada, puede entonces aportarse directamente al prensado sin un período de incubación adicional y sin aportación adicional de agua, y con ello, puede obtenerse el aceite. En contraposición a los procedimientos conocidos en el estado de la técnica, que utilizan elevados contenidos en agua, p. ej., con el fin de impedir la inhibición del producto de las enzimas o mejorar la difusión de las enzimas en los sustratos, en el caso del procedimiento de acuerdo con la invención es suficiente con utilizar el contenido natural en agua de la semilla oleaginosa. Las enzimas conducen a una modificación de las paredes celulares, con lo cual se mejora el vertido del aceite durante el prensado. Para ello, no es necesaria degradación completa alguna de las paredes celulares por parte de las celulasas, hemicelulasas o pectinasas. Las proteasas ayudan a destruir a la membrana con contenido en proteínas que rodea al cuerpo de aceite. La fitasa ayuda, en particular en el caso de simientes ricas en ácido fitínico tales como soja, a reducir la interacción de las proteínas a través de puentes de ácido fitínico y, con ello, a mejorar el flujo de aceite durante el prensado. Debido al bajo contenido en agua, se favorece también el proceso de prensado, debido a que éste coopera a que la torta de prensado continúe siendo transportada a la prensa y que, en virtud de grandes cantidades de agua, no pueda constituirse presión de prensado alguna sobre la simiente y la torta de prensado.

45 Dado que, durante el prensado, en función de la presión de prensado, la temperatura puede aumentar fuertemente, en parte hasta más de 100°C en la torta de prensado, para el procedimiento deberían pasar a emplearse preferiblemente enzimas termoestables. Sin embargo, también es posible el empleo de enzimas mesófilas y/o termotolerantes. De acuerdo con la invención, se utilizan una o varias enzimas que están en condiciones de disolver o, al menos perforar en parte las paredes celulares o bien membranas celulares de células vegetales, o bien relajar la membrana de las oleosinas. En particular, se emplean enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas, lipolíticas, pectinolíticas y/o proteolíticas. Estas enzimas pueden emplearse individualmente o también en combinación, en función de la estructura de la simiente, es conveniente p. ej., la adición de proteasas a simientes ricas en proteínas tales como habas de soja. La adición de enzimas hemicelulolíticas y pectinolíticas es más conveniente en el caso de simientes que contienen de manera incrementada estas sustancias de reserva en las paredes celulares y, por consiguiente, un empleo de celulasas solas no provocaría efecto suficiente alguno en la relajación o perforación de la pared celular. El empleo de pectinasas que atacan a la protopectina de las laminillas centrales, puede conducir a una formación mejorada de pasta para el prensado y, con ello, a una liberación simplificada del aceite. El empleo de galactomanasas puede ser ventajoso, p. ej., en el caso de habas de soja. A menudo, estas actividades enzimáticas están contenidas en productos de pectinasa usuales en el comercio en diferentes proporciones elevadas. En particular, la enzima se elige de celulasas, endoglucanasas, celobiohidrolasas, hemicelulasas, peptidasas,

fosfolipasas, pectinasas o fitasas naturales o preparadas de forma recombinante. Además, pueden utilizarse también variantes derivadas de las enzimas precedentes, por ejemplo enzimas recombinantes producidas sobre la base las enzimas que anteceden, que contienen partes de las enzimas precedentes y que están modificadas en su actividad mediante la adición o separación de dominios de unión de sustrato. Enzimas correspondientes se pueden adquirir en el comercio o bien pueden ser preparadas por un experto en la materia. Las enzimas pueden utilizarse individualmente o en combinación.

El tipo y cantidad de la enzima empleada depende en tal caso del tipo y cantidad de la simiente a tratar. Referido a los productos enzimáticos presentes, las dosificaciones oscilan, por norma general, entre 100 y 20.000 ppm (p/p), más preferiblemente entre 200 y 15.000 ppm (p/p), todavía más preferiblemente entre 500 y 10.000 ppm (p/p). En el caso de enzimas mesófilas, la dosificación puede ser superior con el fin de considerar la pérdida por parte de la inactivación térmica o bien la escasa actividad residual a las elevadas temperaturas durante el prensado.

El prensado puede estar configurado en una etapa o en varias etapas. En el caso de un prensado en varias etapas, la adición de las enzimas es también posible en las distintas etapas de prensado. Al prensado se puede agregar también una etapa de extracción, sin que el género de prensado (grano partido) deba reducirse en su contenido en agua. Procedimientos para llevar a cabo un prensado de aceite son bien conocidos por un experto en la materia. Después del prensado, el aceite se continúa elaborando de manera en sí conocida.

El procedimiento de acuerdo con la invención se distingue por un elevado rendimiento de simiente por unidad de tiempo, al igual que también por una capacidad de prensado y rendimiento de prensado mejorados así como por un menor contenido en fosfolípidos o fosfátidos en el aceite. Mediante el rendimiento incrementado y la velocidad de prensado incrementada se reduce también la demanda de energía por t de aceite obtenido. Dado que el contenido en agua aumenta sólo escasamente mediante la aplicación de la disolución de enzimas sobre la simiente seca, el procedimiento, en el caso de empleo de agentes de extracción, se contempla también sin un secado previo y, por consiguiente, presenta una demanda de energía claramente menor en comparación con procedimientos enzimáticos desarrollados hasta ahora que contenían todas etapas para la reducción del contenido en agua de > 25% hasta menos de 10%, con el fin de no reducir el rendimiento durante la extracción.

Además, el procedimiento de acuerdo con la invención posee la ventaja de que el aceite obtenido está claramente reducido en el contenido en fosfátidos con respecto a procedimientos habituales y de que con ello, p. ej. en el caso de procesos de prensado en varias etapas, la eliminación del mucílago – es decir, la reducción del contenido en fosfátidos – se puede reducir a pequeñas proporciones del aceite obtenido.

El procedimiento de acuerdo con la invención se adecua muy bien en la obtención de aceite para la preparación de aceite alimenticio o biodiesel.

La figura adjunta explica con mayor detalle la invención:

La figura 1 muestra el acortamiento del tiempo de prensado mediante el empleo de celulasa de *Melanocarpus* con un dominio de unión a celulasa de CBH1 de *Trichoderma reesei* (representación de determinaciones triples).

En general, el procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo con enzimas arbitrarias de las precedentemente mencionadas.

En calidad de enzimas preferidas se han manifestado celulasas, en particular endoglucanasas de *Acremonium thermophilum*, que pertenecen a la familia 45 de hidrolasas (división véase http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/GH_intro.html), celulasas, en particular endoglucanasas de *Melanocarpus albomyces* (familia 45 de hidrolasas) que fueron unidas con un dominio de unión a celulasa (CBD – siglas en alemán) de CBH1 de *Trichoderma reesei*, o celulasas, en particular celobiohidrolasas de *Thermoascus aurantiacus* (familia 7 de hidrolasas) que fueron unidas con un dominio de unión a celulasa (CBD) de CBH1 de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* y la beta-glucosidasa de *Chaetomium thermophilum*. Hemicelulasas preferidas son xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa *xlnA* de *Actinomadura flexuosa* y xilanasa *xylA* de *Chaetomium thermophilum*. Pectinasas preferidas son las pectinasas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*. Fosfolipasas preferidas son fosfolipasas del tipo C y/o fosfolipasas del tipo A o B tales como, p. ej., las fosfolipasas de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus* o *Thermomyces lanuginosus*. Fitasas preferidas son las fitasas de *Aspergillus niger*, *E. coli*, *Peniphoro lysii* o variantes derivadas de las mismas tales como Nov9X o la fitasa *Aspergillus consensus*.

Los siguientes ejemplos explican con mayor detalle la invención.

Ejemplo de referencia 1: Determinación de la actividad de la celulasa neutra

La actividad de endo-1,4- β -glucanasa se determina mediante hidrólisis del sustrato carboximetil-celulosa a pH 7, 50°C y un tiempo de incubación de 10 min. Se mide la cantidad liberada de azúcares reductores, referido a la glucosa, después de reacción con ácido dinitrosalicílico mediante detección fotométrica del complejo de color resultante a 540 nm. Una unidad NCU se define como el equivalente que corresponde a la liberación de un nanomol de glucosa por segundo.

1,8 ml de disolución de sustrato (CMC al 3% [Sigma C-56778, baja viscosidad] en tampón HEPES 10 mM pH 7,0 [Sigma H-3375] se regulan en temperatura durante 5 min a 50°C y luego se mezclan con 200 μ l de disolución enzimática diluida y se incuban durante 10 min. Después, se añaden 3 ml de disolución de reactivo DNS (10 g l⁻¹ de ácido dinitro-salicílico [Sigma D-0550], 16 g l⁻¹ de NaOH, 300 g l⁻¹ de tartrato de K-Na [Merck 8087]) y se incuban durante 5 min en un baño de agua hirviendo. Las mediciones de la absorción se llevan a cabo frente a un valor ciego de la reacción tratado de igual manera con agua en lugar de disolución de enzimas.

Ejemplo de referencia 2: Determinación de la actividad de celulasas ácidas termoestables

El método se basa en el método del Ejemplo de referencia 1 y utiliza una temperatura de incubación de 60°C en lugar de 50°C. La segunda desviación se refiere al tampón. El tampón HEPES es reemplazado por un tampón citrato 10 mM, pH 4,8. La unidad de la actividad enzimática es CMU g⁻¹.

Ejemplo de referencia 3: Determinación de la actividad de celobiohidrolasa

Celobiohidrolasa (CBHI) y endoglucanasa (EGI) hidrolizan el sustrato 4-metilumbeliferil- β -D-lactósido y, con ello, liberan 4-metil-umbeliferona (7-hidroxi-4-metilcumarina). Esta reacción puede ser seguida fotométricamente midiendo la absorción de 4-metilumbeliferona bajo condiciones alcalinas a 370 nm. La actividad de β -glucosidasa en la muestra se suprime mediante glucosa 100 mM en la mezcla de reacción. Una unidad PCU se define como la cantidad de actividad enzimática que libera un nmol de 4-metilumbeliferona a partir de 4-metilumbeliferil- β -D-lactósido bajo las condiciones de ensayo (pH 5,0, 50°C, tiempo de incubación de 10 min) por segundo (1 PCU = 1 ncat).

La proporción de endoglucanasa presente puede medirse individualmente mediante la adición de celobiosa 5 mM en la tanda de reacción, con lo que se suprime la reacción de la celobiohidrolasa con 4-metilumbeliferil- β -D-lactósido.

250 μ l de disolución de sustrato (4-metilumbeliferil- β -D-lactósido 1 mM [Sigma M-2405] en tampón acetato de sodio 50 mM, pH 5,0 y 50 μ l de disolución de glucosa 1M en tampón acetato de sodio 50 mM se regulan en temperatura durante 10 min a 50°C. Después de la adición de 200 μ l de disolución de enzimas diluida, se mezcla y se incuba durante 10 min a 50°C. Luego se añade 1 ml de disolución de carbonato de sodio 1M para detener la reacción enzimática, y la absorción se mide frente a un valor ciego tratado de la misma manera con agua en lugar de disolución de enzimas a 370 nm.

Para la calibración se utiliza 7-hidroxi-4-metilcumarina [Aldrich 12,872-4] disuelta en carbonato de sodio 1 M.

Ejemplo de referencia 4: Determinación de la actividad de β -glucosidasa

β -glucosidasa hidroliza el sustrato 4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido para formar 4-nitrofenol y glucosa. La reacción se detiene mediante la adición de álcali, y el 4-nitrofenol que se tiñe en tal caso de amarillo se detecta fotométricamente.

Una unidad BGU se define como el equivalente que corresponde a la liberación de un nanomol de 4-nitrofenol por segundo.

1,8 ml de disolución de sustrato (4-nitrofenil- β -D-glucopiranosido 1 mM [Merck 6793] en tampón citrato 50 mM [Merck 6448], pH 4,8) se regulan en temperatura a 50°C durante 5 min. Después se añaden 200 μ l de disolución de enzimas diluida y se incuban durante 10 min a 50°C. Después de 10 min, se añade 1 ml de disolución de Na₂CO₃ 1M, y la absorción se mide a 400 nm frente a un valor ciego de la reacción tratado de igual manera con agua en lugar de disolución de enzimas.

La curva de calibrado se establece con 4-nitrofenol [Sigma 104-8].

Ejemplo de referencia 5: Determinación del contenido en fosfátidos en el aceite

5 El contenido en fosfátidos (o también denominado contenido en fosfolípidos) se expresa en ppm de fósforo en el aceite. Se determina fotométricamente a 830 nm después de la transformación en cenizas a 850°C bajo la adición de óxido de magnesio en calidad de complejo de molibdato de fósforo. Para la calibración se utiliza K_2HPO_4 .

El contenido en fosfátidos puede determinarse también directamente en el aceite mediante fotometría a la llama con ayuda de un aparato AAS.

10 El contenido en fosfátidos en el aceite total de la semilla de colza de los Ejemplos 1 a 3, extraído según el procedimiento conforme al Ejemplo de referencia 6 con n-hexano, ascendía a aproximadamente 93 ppm de P.

Ejemplo de referencia 6: Determinación del contenido en aceite mediante el procedimiento Soxhlet

15 15 g de semillas de colza molidas o 20-25 g de grano partido de extracción desmenuzado se añaden a un cartucho de extracción [Sartorius nº de pedido FT-1210-033080] y se extrae en un sistema de aparatos Soxhlet a lo largo de 4 h con n-hexano purísimo (Merck). La cantidad de aceite obtenido se pesa después de la evaporación del disolvente en vacío.

20 La semilla de colza de los Ejemplos 1 a 3 contiene 41% de aceite.

Ejemplo de referencia 7: Determinación del color del aceite

25 El aceite obtenido mediante prensado o mediante extracción a partir de una semilla oleaginosa se centrifuga a 12.000 x g durante 5 min para la separación de las partículas en suspensión y luego se determina en el fotómetro el color en una cubeta de 1 cm a 508 nm frente al agua.

El aceite total extraído con hexano según el Ejemplo de referencia 6 de la semilla de colza desmenuzada con un molino de impacto de los Ejemplos 1 a 3, tenía una absorción de 1,2 AU y, con ello, un color propio muy intenso.

30

Ejemplo 1: Empleo de enzimas para aumentar la velocidad de prensadoEnsayo 1:

35 Para el siguiente ensayo se utilizó una endoglucanasa de *Acremonium thermophilum* preparada de forma recombinante con *Trichoderma reesei*, con un peso molecular de aprox. 28,6 kDa y un óptimo de temperatura de aprox. 75°-80°C, tal como se describe, p. ej., en el documento FI 20051318. Sobre semillas de colza oscuras de la razón social DKSH, Holanda, cosecha de 2005, con un contenido en agua de 6,5% (p/p) se roció de forma finamente nebulizada la disolución de enzimas (endoglucanasa), un concentrado de ultrafiltración filtrado en condiciones estériles con una masa seca de aprox. 15% por medio de una jeringa de carrera de émbolo (0,1% p/p)

40 y, a continuación, la semilla de colza se mezcló bien a fondo durante 30 s. La dosificación de la endoglucanasa se encontraba en 64.400 CMC por cada kg de semilla de colza. La colza, así preparada, se sometió a un prensado de una etapa en una prensa de aceite, p. ej. del tipo Ölprinz, de la razón social Kernkraft (www.oelpresse.de), Alemania. En tal caso, la prensa funcionaba con un número de revoluciones de 25 rpm y estaba equipada con una cabeza de prensado con un orificio de 12 mm y se ajustó a una medida de la ranura de 1,5 mm. El tiempo de permanencia de la colza en la cabeza de prensado ascendió a 1-2 min. En la cabeza de prensado se había insertado un termosensor con un aparato de medición conectado de la firma Roth para la determinación de la temperatura de la cabeza de prensado. El aceite se recogió en un platillo de vidrio dispuesto sobre una balanza y se determinó la cantidad y la velocidad de prensado así como la temperatura del aceite. La torta de prensado accedió

45 a otro platillo situado en una balanza separada y, a continuación, se desmenuzó en un molinillo de café con un mecanismo de percusión para la determinación del contenido en aceite residual mediante extracción según el Ejemplo de referencia 6.

50

55 El efecto de la endoglucanasa de *Acremonium* sobre la velocidad de prensado se representa en la Figura 1. Se llevaron a cabo tres repeticiones del ensayo con y sin adición de enzimas. Siempre se empleó la misma cantidad de semilla de colza, de modo que la cantidad de aceite prensado conseguida ascendió en cada caso a aprox. 600 g. Tal como muestra la Figura 1, se proporciona una capacidad de repetición muy elevada a lo largo de todo el tiempo de prensado de aprox. 22 min. Entre las distintas mediciones repetitivas no resultan desviaciones significativas. El aumento del rendimiento de colza mediante el molino de aceite y, con ello, un acortamiento del tiempo de prensado para conseguir un rendimiento constante de aceite se alcanzó en las tres pasadas. La mejora del rendimiento de prensado del molino de aceite condujo a un aumento del aceite obtenido por hora en un 6,6%.

60

Los contenidos en fosfátidos en el aceite prensado eran muy bajos con 6,5-8 ppm de P, y posibilitan un tratamiento ulterior directo del aceite en la industria alimentaria y también para la producción de biodiesel. Los valores del contenido en fosfátidos se encontraban un 5%-10% por debajo de los prensados sin adición de enzimas. Esto era de esperar en los contenidos en fosfátidos absolutamente bajos.

La temperatura de la cabeza de prensado sin adición de enzimas se encontraba, por término medio a lo largo de las tres mediciones, en 77,0°C, mientras que, por el contrario, en el caso de emplear la endoglucanasa, a pesar de un rendimiento incrementado de colza por unidad de tiempo y, con ello, un rozamiento potencial superior en la cabeza de prensado, la temperatura aumentaba por término medio a lo largo de las tres mediciones sólo a valores de 75,4°C. Esto demuestra claramente que con la adición de enzimas se presentaba un prensado más eficaz y más prudente para el aceite.

El color del aceite prensado se mejoró con la adición de enzimas con una absorción por término medio de 0,801 AU a 0,776 AU. Esos valores son claramente mejores que el color del aceite extraído sólo con hexano procedente de la semilla de colza de 1,2 AU y posibilitan así reducir el empleo de agente de blanqueo/tierra decolorante en el tratamiento ulterior para formar aceite alimenticio y ahorrar costes.

Ensayo 2:

En este ensayo se emplearon, con una constitución idéntica del ensayo, una celobiohidrolasa de *Thermoascus aurantiacus*, que porta los dominios de unión a celulosa de CBH1 de *Trichoderma reesei* en el extremo C-terminal (p. ej. preparados conforme al documento WO 2006/117432 A1) en una dosificación de 180 PCU por cada kg de semilla de colza. La celobiohidrolasa tiene un peso molecular de aprox. 46,2 kDa, y el enlazador de CBH1 colgante y los dominios de unión de CBH1 de aprox. 6,8 kDa. La enzima muestra un óptimo de temperatura de aprox. 65°C. Al igual que en la celulasa del Ensayo 1, con ello se podía obtener un aumento del rendimiento y, con ello, una cantidad de aceite un 10,8% superior por unidad de tiempo.

Ensayo 3:

Enzimas más mesófilas que las utilizadas en los Ensayos 1 y 2 o bien el Ejemplo 2, tal como la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei* con un óptimo de temperatura de aprox. 50°C (p. ej. descrita en el documento EP 0 137 280 A1) podían cooperar a dosificaciones más elevadas asimismo en un acortamiento del tiempo relativo de prensado y, con ello, en un aumento del rendimiento. En una dosificación de 376.000 BU por kg de semilla de colza pudo alcanzarse un aumento del rendimiento en torno a 2,1%, y en el caso de una dosificación de 752.000 BU por kg de semilla de colza pudo alcanzarse un aumento del rendimiento en un 6,3%.

Ejemplo 2: Empleo de mezclas de enzimas para el aumento de la velocidad de prensado y mejora del rendimiento en el aceite prensado

Para los ensayos se utilizó otra enzima que en el Ejemplo 1, a saber una celulasa neutra de *Melanocarpus albomyces* preparada de forma recombinante con *Trichoderma reesei*, que contiene un dominio de unión a celulosa de CBH1 de *Trichoderma reesei*, tal como se describe en el documento WO 2006/117432 A1, así como la endoglucanasa de *Acremonium* del Ejemplo 1, Ensayo 1, preparada de forma recombinante con *Trichoderma reesei*. La celulasa de *Melanocarpus* tiene un peso molecular de aprox. 20,2 kDa, y el enlazador colgado con el CBD de la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei* tiene un peso molecular de aprox. 6,8 kDa. La enzima tiene un óptimo de temperatura de aprox. 75°C. Las dosificaciones se encontraban en 64.400 CMC por kg de semilla de colza para la endoglucanasa de *Acremonium* y en 130.000 NCU por kg de semilla de colza para la celulasa neutra de *Melanocarpus*. Las cantidades rociadas de las disoluciones enzimáticas ascendieron en cada caso a 0,1% (p/p) referido a la masa de la semilla de colza. Las disoluciones de enzimas eran ultrafiltrados filtrados en condiciones estériles, con una masa seca de aprox. 15% (p/p). La estructura experimental era como en el Ejemplo 1, con la excepción de que el orificio de las toberas ascendía a sólo 10 mm en lugar de 12 mm. Con ello, se pueden conseguir resultados de prensado mejores. También se utilizó la misma colza (misma carga) que en el Ejemplo 1, de modo que los resultados son directamente equiparables. Los resultados están indicados en la Tabla 1.

Tabla 1: Empleo de una celulasa o bien de una endoglucanasa para la mejora del rendimiento en aceite en el prensado de colza y disminución del tiempo de prensado para conseguir la misma cantidad de aceite. En el caso de la tanda de agua, se empleó la misma cantidad de agua (0,1% (p/p) referido a la masa de semilla de colza) que la que se aplicó a las disoluciones de enzimas.

5

Enzima	Temperatura de la cabeza de prensado [°C]	Tiempo de prensado relativo * [%]	Rendimiento de aceite [%]**	Contenido en aceite residual en la torta de prensado [%]	Contenido en fosfátidos en el aceite prensado [ppm de P]
Ninguna	83,0	100,0	34,7	16,6	11
Sólo agua	86,5	100,2	34,5	16,4	14
Endoglucanasa	82,5	86,9	35,3	16,1	9
Celulasa neutra	81,8	85,4	35,1	16,1	8

* El tiempo de prensado relativo es el tiempo que se requiere con el fin de obtener la misma masa de aceite.
 ** El rendimiento en aceite indica el rendimiento absoluto obtenido de aceite procedente de la semilla de colza, independientemente del tiempo de funcionamiento del proceso de prensado.

10 Tal como muestran los resultados, en el caso de parámetros de prensado correctamente elegidos, en particular la elección del orificio de las toberas de la prensa, se puede aumentar, con ayuda de enzimas correspondientes, el rendimiento de aceite durante el prensado. La ventaja de este aceite es el bajo contenido en fosfátidos que posibilita un tratamiento ulterior directo sin separación del mucílago. Esto también es válido, a pesar de la temperatura de la cabeza de prensado que es aproximadamente 10°C superior en comparación con las condiciones en el Ensayo del Ejemplo 1. Este aumento de temperatura está condicionado por el estrechamiento del orificio de la ranura de la prensa y por la presión de prensado más elevada provocada con ello.

15 En el valor ciego y en el ensayo con agua sin enzima llevado a cabo para fines comparativos, el contenido en fosfátidos en el aceite prensado aumentó con respecto a las condiciones con una tobera mayor (Ejemplo 4), como era de esperar, de 8 hasta 14 ppm de P y, con ello, se encuentra por encima del valor límite vigente para el aceite alimentario y en el límite para el contenido admisible para la producción de biodiesel. Sin embargo, los contenidos en fosfátidos en el aceite prensado con la adición de enzimas, al igual que en el Ejemplo 4 se encontraban a un nivel más bajo de sólo 8-9 ppm de P. La adición de enzimas ha actuado por lo tanto también positivamente sobre la reducción de los contenidos en fosfátidos en el aceite prensado en comparación con el aceite que se obtuvo sin la adición de enzimas. Esto posibilita el tratamiento ulterior del aceite así obtenido directamente sin separación del mucílago para formar aceite alimenticio, al igual que para formar biodiesel.

25 Además, el tiempo que se requiere para obtener la misma cantidad de aceite prensado (tiempo de prensado relativo) se puede de nuevo acortar claramente y, por consiguiente, se puede aumentar el rendimiento de los molinos de aceite. Los tiempos de funcionamiento o bien tiempos de prensado relativos no sólo eran un 6% más cortos, sino que se acortaban incluso hasta un 14,6%.

30 Resultados similares se podían obtener también con una beta-glucanasa de *Chaetomium thermophilum*, preparada de forma recombinante con *T. reesei*, con un peso molecular de aprox. 76,4 kDa y un óptimo de temperatura de 65°C, preparada, por ejemplo, tal como se describe en el documento FI 20051318. En este caso, la dosificación se encontraba en 17.840 BGU por cada kg de semilla de colza. Tanto el rendimiento espacio-tiempo (aceite obtenido por aparato, kg de semilla de colza y unidad de tiempo) aumentó en un 3%, al igual que lo hizo también el rendimiento en aceite absoluto aumentó mediante prensado en un 2%.

35

Ejemplo 3: Efecto del empleo de enzimas sobre el contenido en fosfátidos en el extracto de aceite residual

40 En los ensayos de los Ejemplos 1 y 2 se homogeneizó y desmenuzó la torta de prensado recogida. A partir de partes alícuotas de la torta de prensado desmenuzada se extrajo el aceite contenido todavía en la torta de prensado, denominado también aceite residual, según el Ejemplo de referencia 6 y en él se determinó el contenido en fosfátidos según el Ejemplo de referencia 5. Los resultados están recopilados en la siguiente tabla.

Tabla 2: Determinación del contenido en fosfátidos del aceite residual extraído de la torta de prensado

Enzima	Proporción de aceite de prensado*** en el aceite total **** [%]	Contenido en fosfátidos en el aceite de prensado [ppm de P]	Contenido en fosfátidos en el aceite de extracción [ppm de P]
Sólo extracción *	n.a.	n.a.	85 – 99
Ninguna **	83,7	9	73,6
Endoglucanasa	83,6	8	70,5

- * En esta tanda. la semilla de colza sólo se desmenuzó y luego se extrajo directamente con n-hexano sin un prensado antepuesto.
- ** En esta tanda no se añadió enzima alguna, y la semilla de colza se prensó directamente.
- *** Aceite de prensado: aceite obtenido mediante prensado
- **** Aceite total: cantidad de aceite obtenida mediante extracción de la semilla de colza desmenuzada.
- n. a. no aplicable

- 5 Tal como muestran los resultados que anteceden, mediante el empleo de enzimas se impide fuertemente la liberación de los fosfátidos residuales en el caso de extracción del aceite residual que todavía queda en la torta de prensado (aceite total menos aceite de prensado; aprox. 16-17% del aceite total). Si se extrae el aceite total, entonces se extraen conjuntamente aprox. 3,5 a 4,0 mg de P de fosfolípidos (cantidad total de aceite * contenido en fosfátidos del aceite obtenido mediante extracción). El aceite de prensado contiene sólo 0,274 a 0,309 mg de P (aceite de prensado * contenido en fosfátidos en el aceite de prensado) y el aceite residual extraído a continuación contiene de nuevo 0,474 a 0,492 mg de P (aceite residual * contenido en fosfátidos en el aceite residual). Con ello, mediante la adición de enzimas permanecen en la torta de prensado, también después de la extracción que sigue al prensado, 2,7 a 3,3 mg de P de fosfolípidos, lo cual corresponde a más de $\frac{3}{4}$ a $\frac{4}{5}$ de los fosfolípidos en la colza a obtener en conjunto mediante pura extracción. El empleo de enzimas conduce, por lo tanto, también aquí a una mejora del aceite residual extraído mediante reducción del contenido en fosfolípidos en comparación con la extracción pura y, con ello, a una reducción de la complejidad de separación de mucílago a llevar a cabo subsiguientemente.
- 10
- 15

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la obtención de aceite a partir de semillas, caracterizado por que
- 5 a) una disolución acuosa, que contiene una o varias enzimas celulolíticas y/o lipolíticas y/o pectinolíticas y/o proteolíticas y/o fitasa se rocía directamente sobre la simiente seca,
- b) la simiente, así obtenida, se aporta directamente sin un período de incubación adicional y sin aportación adicional de agua, de manera en sí conocida, a un prensado de una o varias etapas, eventualmente acoplado con una extracción, y
- 10 c) el aceite se obtiene de manera en sí conocida y, eventualmente, se continúa elaborando,
- aumentando el agua incorporada mediante el rociado de la disolución de enzimas el contenido natural en agua de las simientes (4-8% p/p) en aprox. 0,1 hasta como máximo 2% (p/p) referido a la masa de la simiente.
- 15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la enzima se elige de celulasas, endoglucanasas, celobiohidrolasas, hemicelulasas, pectinasas, fosfolipasas, proteasas o fitasas naturales o recombinantes.
- 3.- Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que la enzima se elige de endoglucanasas de *Acremonium thermophilum*, endoglucanasas de *Melanocarpus albomyces*, eventualmente unidas con un dominio de unión a celulasa de CBH1 de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasas de *Thermoascus aurantiacus*, eventualmente unidas con un dominio de unión a celulasa de CBH1 de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei* y la beta-glucosidasa de *Chaetomium thermophilum*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, xilanasa *xlnA* de *Actinoadura flexuosa*, xilanasa *xylA* de *Chaetomium thermophilum*, pectinasas de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*, fosfolipasas A, B o C de *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus* o *Thermomyces lanuginosus*.
- 20 4.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la simiente se descascarilla y/o desmenuza antes del rociado de la enzima.
- 25 5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la enzima se rocía adicionalmente entre los prensados individuales sobre la simiente ya prensada.
- 30 6.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que después del prensado se lleva a cabo una etapa de extracción.
- 35 7.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que las semillas se eligen de simientes con contenido en aceite.
- 8.- Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que las simientes con contenido en aceite se eligen de habas de soja, cacahuetes, semillas de algodón, semillas de girasol, gérmenes de maíz y semillas de colza.
- 40 9.- Uso de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 en la preparación de aceite alimenticio.
- 10.- Uso de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8 en la producción de biodiesel.