



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 476**

51 Int. Cl.:

**A23J 1/14** (2006.01)

**A23K 1/14** (2006.01)

**A23K 1/18** (2006.01)

**A23J 3/14** (2006.01)

**A23L 1/211** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01933505 .8**

86 Fecha de presentación : **14.05.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1282361**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.02.2003**

54

Título: **Fraccionamiento y procesamiento de alimento de semillas oleaginosas.**

30

Prioridad: **15.05.2000 US 204120 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2007**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2007**

73

Titular/es: **University of Saskatchewan  
Box 5000 RPO University  
110 Gymnasium Place  
Saskatoon, SK S7N 4J8, CA**

72

Inventor/es: **Maenz, David, D.;**  
**Newkirk, Rex, W.;**  
**Classen, Henry, L. y**  
**Tyler, Robert, T.**

74

Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 272 476 T3

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

# ES 2 272 476 T3

## DESCRIPCIÓN

Fraccionamiento y procesamiento de alimento de semillas oleaginosas.

### 5 **Campo técnico**

Esta invención generalmente se refiere a un procedimiento para la extracción acuosa, fraccionamiento y tratamiento enzimático de materiales de semillas oleaginosas para generar productos valiosos sin subproductos de bajo valor o corrientes de desecho significativas. En particular, el esquema de fraccionamiento genera un ingrediente de alimentación libre de proteína principalmente para uso con animales rumiantes y una segunda fracción de alta proteína desfinitizada. La fracción de alta proteína desfinitizada tiene un valor como ingrediente de alimentación para una diversidad de especies de animales.

### **Técnica antecedente**

Se han dirigido esfuerzos considerables hacia el desarrollo de sistemas de procesamiento acuosos y técnicas para la producción de concentrados de proteína de alto valor y aislados de proteína (< 90% de proteína) a partir de semillas oleaginosas tal como soja. El objetivo de todos estos sistemas de procesamiento existentes y técnicas es para generar un solo producto de muy alto valor proteico. Poca o ninguna consideración se proporciona al valor del componente no proteico del material de partida. Los sistemas de procesamiento no se han proyectado para fraccionar el material de partida en una serie de productos valiosos sin la generación de subproducto de bajo valor o corrientes de desecho.

Las técnicas y sistemas de procesamiento dirigidas hacia la producción de un solo producto de alto valor proteico a partir de semillas oleaginosas a menudo hacen uso de altos niveles de agua y compuestos químicos tales como sales, ácido o base para lograr extracción y aislamiento de proteína eficaz. Los sistemas que requieren uso extensivo de agua y compuestos químicos son a menudo costosos. Además los costes están asociados a la disposición de productos de bajo valor o corrientes de desecho.

La semilla de canola o colza consta de aproximadamente 40% de aceite y 60% de constituyentes no leosos. En el procesamiento comercial, la mayoría del aceite se retira de la semilla o bien mediante extracción o mediante expulsión con disolvente. En los sistemas de procesamiento basados en la extracción con disolvente, el material no oleoso existe como un orujo o escama blanca cargado de disolvente. Típicamente, el disolvente se retira de la escama blanca mediante un procedimiento que implica la aplicación de vapor y calor para generar un producto tostado desolvatado llamado harina. La harina contiene aproximadamente 35% de proteína y se vende como un ingrediente de alimentación para la inclusión en los alimentos de dietas a una diversidad de clases de animales incluyendo cerdos, aves y ganado vacuno.

La proteína de la semilla de canola tiene excelente valor alimenticio. La proteína es rica en metionina (2,0% de proteína total) y lisina (5,8% de proteína total) con buen equilibrio de aminoácidos esenciales. En la revisión de la calidad nutricional de diversas fuentes proteicas, Friedman M. (J. Agric. Food Chem. 44: 6 - 29, 1996) reseñaron una relación eficaz de proteína (PER) de 3,29 para concentrado de semilla de colza, 3,13 para caseína y 1,60 para concentrado de soja. El concentrado de proteína de semilla de colza tenía el mayor PEOR de todas las fuentes de proteínas vegetales reseñadas. Como tal la proteína de semilla de canola o colza, en sí misma, tiene excelente valor alimentario, y se puede considerar como excepcional en comparación con otras proteínas de plantas. Prendergast, A. F., y col., (Nort Aquacult: 10: 15 - 20, 1994) encontraron que el concentrado de proteína de semilla de colza desfinitizada podría reemplazar el 100% de harina de pescado de alta calidad en dietas que alimentas a la trucha arco iris sin afectar de manera adversa el comportamiento de crecimiento y eficacia de alimentación del pez.

Los animales no utilizan completamente la proteína en valor alimenticio de la proteína de semilla de canola o colza cuando se suministra la proteína en la forma convencional como parte de la harina. La harina de canola tostada desolvatada no desmondada contiene altos niveles de fibra. La fibra tiene poca alimentación para animales tales como peces, pollos y cerdos jóvenes y de este modo diluye la proteína y contenido en energía de la harina. Además, los factores antinutricionales, tales como compuestos fenólicos, asociados a la fibra pueden tener un impacto negativo en el comportamiento de animales monogástricos tales como cerdos, pollos y peces. El procedimiento de tostado empleado durante la preparación de del producto de harina final disminuye la solubilidad de la proteína de la harina y se ha mostrado que disminuye la digestibilidad de la lisina cuando se alimenta a pollos (Newkirk, R. W., y col., Poultry. Sci. 76: 64, 2000). La harina de canola excepcionalmente altos niveles de ácido fítico (aproximadamente 3% de la harina). El ácido fítico es la forma almacenada de fósforo en la semilla y se digiere de manera escasa por las especies monogástricas y por lo tanto disminuye la digestibilidad de nutrientes. Además, el fósforo en la molécula de ácido fítico está ampliamente no disponible para el animal y se evacua con las heces. Dada esta escasa digestibilidad del fitato-P, las dietas se deben formular con P de dieta suficientemente disponible para que reúna los requerimientos del animal y esto a menudo incrementa el coste de la ración. Además, el P no digerido en el estiércol puede dañar al ambiente y es de considerable interés en las áreas de producción de ganado intensiva. En conjunto, el contenido alto en fibra y alto en fitato de harina de canola limita el valor de alimentario como una fuente de proteína para animales monogástricos tales como cerdos, pollos y peces.

Los animales rumiantes, tal como ganado vacuno, pueden extraer energía de la fibra a través de la fermentación en el rumen. Además, los microbios del rumen pueden hidrolizar eficazmente fitato y de este modo el potencial para

## ES 2 272 476 T3

los efectos antinutricionales y daño para el ambiente del ácido fítico en la dieta es menor de interés en la alimentación de los animales rumiantes. La proteína altamente soluble se digiere rápidamente durante el paso posterior a través del intestino delgado tiene el mayor valor alimenticio proteico para animales rumiantes. Como los ingredientes de alimentación para animales rumiantes, la proteína altamente soluble en la semilla de canola son de menor valor alimenticio que la fracción de las proteínas de canola totales que son relativamente insolubles.

La técnica anterior en este área se centra en procedimientos que logran la extracción eficaz de proteína a partir de semillas oleaginosas basadas en el material de partida seguido de la concentración y aislamiento de la proteína en un solo producto de alto valor.

La patente de Estados Unidos N° 5.658.714 enseña que la proteína se puede extraer de manera eficaz a partir de harina vegetal ajustando el pH del medio de extracto en el intervalo entre 7,0 y 10,0. La proteína se concentra después mediante ultrafiltración precipita ajustando el pH del permeado a 3,5 - 6,0. El fitato es resistente a la etapa de precipitación de proteína y de este modo el contenido en fitato del concentrado de la proteína final se describe como menos que 1% de la materia seca en el aislado de proteína.

La patente de Estados Unidos N° 4.420.425 describe un procedimiento de extracción acuosa de semilla de soja desgrasada que usa condiciones alcalinas con una relación de medio de extracción: material de partida de semilla oleaginosa de > 10,1. En este procedimiento, los sólidos en el extracto se retiran mediante filtración, la proteína solubilizada se pasteuriza, y el extracto se pasa a través de una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular de > 100.000 para generar un concentrado de proteína.

La patente de Estados Unidos N° 5.989.600 enseña que la solubilidad de proteínas vegetales se puede incrementar tratando la fuente de proteína vegetal con enzimas tales como fitasa y/o enzimas proteolíticas. Las enzimas se aplican directamente al material de partida antes de cualquier fase de extracción con el objetivo de mejorar la solubilidad de proteína.

La patente de Estados Unidos N° 3.966.971 enseña que la fitasa de ácido se puede añadir a una dispersión acuosa de fuente de proteína vegetal para facilitar la extracción de proteína. La suspensión acuosa se mantiene a un pH de solubilidad de proteína mínima para la proteína dada y se somete a la digestión con la fitasa de ácido para promover la solubilidad de proteína. La mezcla se trata con calor a temperatura suficiente para inactivar la actividad enzimática y solubles se separan después del residuo de digestión insoluble. El residuo solubilizado se describe por separarse del residuo insoluble mediante centrifugación o filtración o una combinación de estos procedimientos. El pH del extracto líquido se ajusta después según se desee y se seca para generar un producto final.

La patente de Estados Unidos N° 4.435.319 enseña que la proteína se puede extraer de harina de girasol tratando una suspensión acuosa de la harina con un ácido a un pH entre 4,0 y 7,0. Los residuos solubles e insolubles se separan y el material insoluble se trata continuamente con una solución de ácido hasta que se ha alcanzado la extracción deseada de proteína. Las proteínas extraídas después se recuperan mediante precipitación o mediante ultrafiltración.

La patente de Estados Unidos N° 3.635.726 describe un procedimiento para la producción de una proteína de soja aislada mediante la extracción del material de partida de soja en condiciones alcalinas mediante el que el pH es superior al pH isoelectrico fr glicina. Después de separar el extracto del residuo insoluble el pH del extracto se reduce al pH isoelectrico de glicina para inducir pa precipitación de proteína.

La patente de Estados Unidos N° 4.418.013 describe un procedimiento para la extracción de proteína a partir de fuentes de proteína vegetales que constan de extracción en agua sin el uso de aditivos químicos en el medio de extracción de agua. Los extractos solubles se separan después de los sólidos y se diluyen en un cuerpo de agua enfriada para inducir la formación de partículas de proteínas que después se retiran del agua y se secan para formar un aislado de proteína que se describe como sustancialmente no desnaturalizado.

La publicación de patente internacional WO 95/27406 enseña que la fitasa se puede añadir a la suspensión de agua de un material de partida basada en soja. En condiciones controladas de pH y temperatura el contenido en fitato se reduce a < 50% del contenido de fitato en el material de partida. En una realización preferida de esta invención el material de partida de soja se ha expuesto a tratamiento de baja temperatura y tiene un índice de solubilidad de nitrógeno de < 50%. El pH del efluente está en el intervalo de 7 - 9 y se separa el efluente en una fracción soluble e insoluble. La fracción soluble se trata después con calor para inactivar las enzimas y los solubles se concentran mediante nanofiltración y se secan para formar un producto final. Se desechan la fracción insoluble y el permeado formado durante nanofiltración se.

Tzeng y col., (Journal of Food Science 1990, 55: 1147 - 1156) describen una serie de experimentos en el fraccionamiento de diversos materiales de semillas oleaginosas que usan un esquema de procedimiento acuoso. La harina de canola comercial y escama blanca canola no tostada desolvatada extraída con aceite se usaron como materiales de partida. Todas las extracciones se llevaron a cabo en condiciones alcalinas acuosas de pH igual o mayor que 10. En este procedimiento, se separan el residuo de los sólidos no extraídos, y el pH del extracto se ajustó hasta 3,5 para inducir la precipitación de proteína isoelectrica. La proteína precipitada se separo de los solubles restantes mediante centrifugación. La proteína soluble se concentró mediante ultrafiltración y diafiltración usando una membrana de corte de peso molecular de 10.000. El residuo insoluble, proteína precipitada isoelectrica y la proteína soluble ultrafiltrada

se ensayaron para evaluar los niveles de materia seca, proteína, fitato y glucosinolato. En estas condiciones el residuo no extraído se harina de canola contenía 67% del sólido y 62% de la proteína presente en el material de partida. En una base de materia seca, el residuo de harina tenía un 42% de proteína y un 5,7% de contenido en fitato; la proteína precipitada isoeléctrica tenía un 83% de proteína y un 2% de contenido en fitato; y la proteína soluble tenía un 86% de proteína y un 1,7% de contenido en fitato. La proteína isoeléctrica y soluble contenía un 22% y un 11% respectivamente de la proteína total en el material de partida de harina de canola. En comparación, la extracción de proteína en condiciones alcalinas era sustancialmente mayor cuando se usaba escama blanca de canola no tostada desolvatada como material de partida. En este caso, el residuo no extraído contenía un 50% del sólido y un 15% de la proteína encontrada en el material de partida. En base de materia seca, el residuo de harina tenía un 11% de proteína y un 6,5% de contenido en fitato; la proteína precipitada isoeléctrica tenía un 87% de proteína y un 1% de contenido en fitato. La proteína isoeléctrica y soluble contenía un 43% y un 33% respectivamente de la proteína total en el material de partida de la escama blanca de canola. La extracción de nitrógeno muy alta de escama blanca de canola refleja la alta solubilidad de nitrógeno del material de partida en combinación con condiciones de extracción alcalinas.

El documento WO 98/56260 describe un procedimiento para producir un producto nutricional de semillas oleaginosas, que comprende las etapas de a) añadir agua a un material de semilla oleaginosa obtenido mediante rotura mecánica del total, opcionalmente semillas oleaginosas sin vainas para proporcionar una mescal acuosa de dicho material de dicha semilla oleaginosa, incluyendo dicha mezcla sustancialmente los componentes fibrosos y acuosos proteicos enteros de dichas semillas y que tienen las proteínas de semillas oleaginosas en una condición sustancialmente no desnaturalizada; b) añadir una enzima proteolítica capaz de degradar proteínas de semillas oleaginosas incluyendo factores antinutricionales proteináceos en dicha mezcla acuosa; c) incubar dicha mezcla a una temperatura por debajo de la temperatura de inactivación de dicha enzima durante un tiempo suficiente para provocar degradación de dichas proteínas de dichas proteínas de semillas oleaginosas y factores antinutricionales; y d) cuando se necesite, concentrar y/o secar el producto resultante o una parte del mismo.

El documento US-A-3.736.147 describe un procedimiento para preparar productos proteicos de plantas que tiene bajo contenido en ácido fítico que comprende someter la proteína de una fuente de proteína a ultrafiltración a un pH de 4,5 - 7 en presencia de fitasa. La fuente de proteína puede ser una harina de semilla desgrasada.

El documento EP-A-0 976 331 describe un procedimiento para producir una composición de polipéptido que comprende independientemente la hidrólisis de los componentes 7S ( $\beta$ -conglitin) y 11S (glicin) de proteína de semilla de soja para obtener la composición e polipéptidos que contiene los hidrolizados de ambos componentes.

El documento US-A-3.966.971 describe un procedimiento para obtener proteína de una fuente de proteína vegetal que comprende el lavado de una fuente de proteína vegetal con agua mantenida a un pH de solubilidad de proteína mínima, sometiendo el material de fuente de proteína vegetal a digestión en agua a un pH de entre aproximadamente 2 a 6 en presencia de fitasa de ácido, y separar un extracto líquido; que contiene proteína soluble del residuo de digestión insoluble.

Se menciona que ninguno de los documentos de US-A-3.736.147, EP- A-0 976 331, US-A-3.966.971 se refiere a la producción de alimento animal.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 ilustra la concentración de fitato de un extracto de canola después de 60 minutos de hidrólisis con o bien FFI o fitasas Natufos.

### Descripción de la invención

La presente invención en su aspecto más amplio se refiere a un procedimiento para la extracción acuosa y fraccionamiento de un material de semillas oleaginosas que se origina de semilla de colza o canola que comprende: (a) mezclar el material de semilla oleaginosa con una solución acuosa cuyo pH es más de 2 y menos que 12 a una concentración de 10 - 50% p/v para formar una mezcla que comprende una solución acuosa que contiene proteína extraída, pequeños fragmentos sólidos y carne de células del material de semilla oleaginosa y material fibroso, (b) someter dicha mezcla a separación mediante filtración y selección para obtener, como el filtrado, un extracto acuoso que comprende la proteína extraída y los pequeños fragmentos sólidos de la carne de células, mientras que dejan una extracción de residuos de sólidos que incluyen el material fibroso, (c) tratar dicho extracto acuoso con una enzima enriquecida en fitasa para obtener una fracción de extracto enriquecido en proteína desfitinizada, (d) precipitar una fracción de la proteína en dicha fracción de extracto enriquecida en proteína desfitinizada, y (e) someter dicha fracción de extracto que contiene proteína precipitada a la separación de sólido - líquido para obtener una fracción líquida desfitinizada que contiene proteínas solubles y una fracción de sólidos desfitinizada rica en proteínas.

El resultado es una serie de productos valiosos sin la generación de un subproducto o corrientes de desecho. El procedimiento de la invención proporciona una extracción eficaz mientras se mantiene un contenido en proteína en el material no extraído de manera que tiene un buen valor alimenticio como un fibra proteica para animales rumiantes. El extracto líquido obtenido después de la separación de la proteína precipitada se puede además procesar mediante filtración de membrana y posterior generación de productos de alto valor.

## Los mejores modos de llevar a cabo la invención

La completa utilización del valor inherente de los constituyentes no oleosos de una semilla no oleosa, tal como semilla de colza, canola, o semilla de soja requiere un procedimiento de fraccionamiento en el que los constituyentes se parten en productos distintos con buen valor para usos dirigidos. Un sistema de procesamiento de fraccionamiento de acuerdo con la presente invención satisface los siguientes criterios:

Todos los productos tienen buen valor, por ejemplo para ingredientes de alimentación para una diversidad de especies tales como peces, cerdos, pollos, y ganado vacuno, o ingredientes de alimentación para uso humano.

La eficacia de extracción de nutrientes tal como proteína es adecuada para generar las cantidades sustanciales de productos de alto valor pero no debe comprometer demasiado el valor del residuo extraído. El residuo extraído retiene buen valor como fibra proteica para animales nutrientes. El contenido de fibra y factores antinutricionales, tal como ácido fítico, en productos de alto valor es cero o a niveles tolerablemente bajos. El procedimiento no genera subproductos de bajo valor o corrientes de desecho.

El sistema de procesamiento de fraccionamiento genera productos intermedios deshidratados con un contenido mínimo de humedad para disminuir los costes de secado del procedimiento global.

El sistema de fraccionamiento - procesamiento no requiere un exceso de humedad o compuestos químicos que incrementan los costes globales de procedimiento o bien a través de la pérdida y reemplazo o a través de los costes asociados a reciclado de humedad y compuestos químicos.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención describe un esquema de procesamiento de fraccionamiento usado con un material de semilla oleaginosa que se origina a partir de canola o semilla de soja para fraccionar eficazmente los componentes no oleosos en la semilla oleaginosa en distintos productos. Cada uno de estos productos tiene un valor considerable y de este modo el procedimiento no genera ningún desecho sustantivo o corrientes de desecho. Además, el procedimiento genera productos intermedios deshidratados con un contenido en humedad mínimo y no requiere altos niveles de humedad o compuestos químicos. El procedimiento es distinto de la técnica anterior ya que centra en la extracción altamente eficaz y aislamiento de la proteína de las semillas oleaginosas y no en el fraccionamiento eficaz del material en productos de alto valor que hacen uso completo de los componentes no oleosos de la semilla.

La invención usa materiales de semillas oleaginosas que se originan a partir de semilla de colza o canola, como material de partida. Particularmente, el material de partida es escamas no extraídas en aceite o ligeramente tostadas a partir de semilla de colza o canola. En la presente invención, las escamas no o ligeramente tostadas se definen como el residuo de la semilla que permanece después de la extracción oleosa, en la que este material se ha desolventizado sin exposición a calor sustancial. Más precisamente, las escamas no o ligeramente tostadas se definen por tener un índice de dispersabilidad de nitrógeno (NPI) de  $> 50\%$ . El índice de dispersabilidad de nitrógeno se puede determinar mediante el procedimiento oficial AOCS de Ba.

La presente invención describe un procedimiento de extracción y desfitinización de dos etapas. En la primera etapa, el material de partida se mezcla con un medio de extracción acuoso a  $10\%$  (p/v) a  $50\%$  (p/v), más preferiblemente al  $15\%$  (p/v) a aproximadamente  $30\%$  (p/v). El medio de extracción acuoso puede contener sal, tal como NaCl o KCl; ácido, tal como HCl o ácido cítrico; o base, tal como NaOH o KOH. Las sales pueden estar presentes a  $< 2\%$  (p/v). Los ácidos pueden estar incluidos de manera que el pH del medio de extracción es  $> 2$ , y las bases pueden estar incluidas de manera que el pH  $< 12$ . En una realización preferida de la invención el medio de extracción consta de agua sin ninguna adición de sal, ácido o base.

Después de mezclar el material de partida con el medio de extracción, la mezcla se deshidrata usando sistemas tales como compresión y/o filtración a vacío y tamizado a través de un tamiz o cualquier otro sistema de separación que retirará un extracto constituido por líquido que contiene materiales solubles más pequeños sólidos de fragmentos. Los pequeños sólidos de fragmentos en el extracto están comprendidos principalmente por carnes de células. El material del residuo extraído constituido por grandes partículas extraídas tales como vainas y fragmentos mayores de carnes de células extraídas. La mayoría de los compuestos fenólicos en el material de partida se encuentran en las estructuras de fibra en las vainas de las semillas. En las condiciones de extracción suaves sin uso de ácido, base o sal en el medio de extracción empleado en esta invención, la oxidación de compuestos fenólicos no se produce y no se requiere la inclusión de altos niveles de compuestos tales como  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  que inhiben la oxidación de compuestos fenólicos.

La retirada de pequeños fragmentos de carnes de células junto con los compuestos solubles en el extracto a granel es una extracción eficaz e incluso balanceada. Se recupera más del  $30\%$ , preferiblemente más del  $50\%$  de la proteína total en el extracto a granel. En un aspecto preferido de la invención aproximadamente  $65\%$  de la proteína total se recupera en el extracto a granel. De acuerdo con la invención, el material extraído retiene considerablemente valor como un alimento de fibra proteína para animales rumiantes. El contenido en proteína es  $> 20$ , preferiblemente  $> 30\%$  de la materia seca. La deshidratación del material extraído es un procedimiento relativamente eficaz de manera que el contenido en humedad después del procedimiento de deshidratación es  $< 70\%$  de la masa total. En la presente invención, existe la opción para procesar además el material extraído deshidratado para incrementar el valor de este material como un ingrediente de alimentación de fibra proteica. Por ejemplo, el material se debe tratar adicionalmente con un compuestos químico tal como NaOH, en la forma conocida, para incrementar la digestibilidad de la fibra.

Además, se pueden usar procedimientos conocidos de la ruptura de fibra física tal como vapor o explosión de fibra a base de amoníaco para incrementar la digestibilidad de la fibra. Finalmente, el material se puede tratar con enzimas de degradación de fibras tales como estearasa de ácido ferúlico, celulasa y hemicelulasa para incrementar la digestibilidad de la fibra dentro del producto cuando se alimenta a animales rumiantes. De acuerdo con la invención, el material extraído deshidratado se puede secar, de la forma conocida, para producir un producto final, con buen valor como alimento de fibra proteica para animales rumiantes tales como ganado vacuno y ovejas.

En la segunda etapa de la invención, el extracto se desfitiniza total o parcialmente mediante incubación con un producto enzimático enriquecido con fitasa en condiciones controladas de temperatura y duración. El pH del extracto a granel se puede modificar para promover la actividad de la enzima. Además, quelantes químicos tales como ácido cítrico se pueden añadir al extracto para promover el procedimiento de desfitinización. Maenz, D. D. y col., (Anl. Feed Sci. Tech. 81 Tech. 81: 177 - 192, 1999) demostró que los quelantes tal como ácido cítrico cuando se añaden a una suspensión acuosa de fitasa que contiene harina de canola potenciará el procedimiento de desfitinización. Presumiblemente esto se produce a través de un mecanismo de quelación competitiva mediante el cual el quelante se une a minerales por lo tanto disminuyendo el mineral que se une a ácido fítico e incrementando la susceptibilidad al sustrato a la hidrólisis por la enzima. En una realización preferida de la invención, no se usan ni modificación de pH ni quelantes químicos en la etapa de desfitinización. De acuerdo con la invención, la incubación de enzima se puede producir entre 1 y 600 minutos a una temperatura de 10 - 70°C. Sin embargo, el procedimiento de desfitinización es relativamente eficaz, y, en una realización preferida de la invención la reacción se produce durante 60 minutos a 50°C. Se extrae más de 50%, preferiblemente más de 70%, del total de fitato en el extracto a granel se hidroliza durante la fase de tratamiento de enzima.

En la presente invención, el contenido proteico del extracto desfitinizado es > 40%, preferiblemente > 50% de la materia seca. El contenido en fitato del extracto desfitinizado es < 1,0%, preferiblemente < 0,5% de materia seca. Existe la opción de secar el extracto, de la forma conocida, para generar un producto de bajo contenido en fitato, alto contenido en proteína. Este producto tendría buen valor como ingrediente de alimentación para animales tales como peces, cerdos, aves, rumiantes y animales de compañía.

En una realización preferida de la invención, el valor del extracto se incrementa mediante fraccionamiento adicional. Como ejemplo, una parte de la proteína en el extracto se puede precipitar, de la manera conocida, mediante técnicas tales como precipitación isoelectrica. En este procedimiento particular el pH del extracto se ajusta al valor del pK de las proteínas en solución en el extracto para inducir la precipitación. Las proteínas precipitadas se separan después del líquido y se secan para formar un producto de bajo contenido en fitato, alto contenido en proteína. En un segundo ejemplo, las proteínas en el extracto se pueden concentrar, de la manera conocida, mediante técnicas tales como filtración de membrana, que separan las moléculas basándose en la diferencia en peso molecular. Pasando el extracto a través de una membrana de ultrafiltración, proteínas solubles se concentran en el retenido y parcialmente se separan a partir de los compuestos de bajo peso molecular. El concentrado de proteína formado durante esta etapa de ultrafiltración se puede secar para generar un producto de bajo contenido en fitato, alto contenido en proteína. Además, se pueden llevar a cabo dos o más etapas de concentración de proteína en secuencia para producir múltiples productos a partir del extracto. Como ejemplo, se puede usar una etapa de precipitación, tal como precipitación isoelectrica para precipitar una parte de la proteína total en el extracto. Este material se puede retirar del líquido y el líquido después pasar a través de una membrana de ultrafiltración para generar un concentrado de proteína. En este sistema se preparan dos productos proteicos a partir del extracto.

En una realización preferida de la invención, el extracto desfitinizado se procesa adicionalmente mediante tratamiento por calor. El extracto desfitinizado se calienta a > 80°C durante más de 1 minuto. En una realización preferida, la temperatura del extracto desfitinizado se incrementa hasta 95°C y se mantiene durante 5 minutos. Una parte de la proteína total en el extracto es susceptible a coagulación de la proteína inducida por calor. Además, el procedimiento de tratamiento por calor sirve para pasteurizar el extracto y por lo tanto reducir la carga bacteriana en los productos finales. Además, el tratamiento por calor desnaturará cualquier actividad enzimática añadida al extracto durante la fase de tratamiento por enzima. Opcionalmente, se añaden compuestos químicos tales como CaSO<sub>4</sub> que se sabe que potencian el coagulado de proteínas inducido por calor. Además, un ácido tal como HCl o una base tal como NaOH, se añaden opcionalmente al extracto para potenciar el procedimiento de coagulación inducida por calor. En una realización preferida, no se añade ningún químico y la coagulación de proteína inducida por calor se produce sin suplemento del extracto. El extracto desfitinizado tratado por calor se procesa después mediante sistemas tales como tamizado a través de tamices metálicos en combinación con compresión y/o filtración a vacío y/o cualesquiera otros sistemas de separación que retira de manera eficaz el líquido de los sólidos (la proteína coagulada más los pequeños fragmentos sólidos). De acuerdo con la invención, > 30%, preferiblemente > 50%, de la proteína total en el extracto desfitinizado tratado por calor está en la forma de sólidos que se pueden deshidratar fácilmente como se ha descrito anteriormente. La deshidratación es un procedimiento eficaz de manera que el contenido en humedad después del procedimiento de deshidratación es < 70% de la masa total de los sólidos deshidratados. El contenido bajo en humedad del producto proteico deshidratado formado a partir de un extracto es inesperado y útil en esos ahorros sustanciales se producirán mediante costes de secado más bajos para generar el producto final. De acuerdo con la invención, la proteína constituye > 45%, preferiblemente > 55%, de la materia seca en los sólidos deshidratados que se separan del extracto tratado por calor, desfitinizado. De acuerdo con la invención, el contenido en fitato es < 1%, preferiblemente < 0,5%, de la materia seca en los sólidos deshidratados. En la presente invención, los sólidos deshidratados se pueden secar fácilmente, de la forma conocida, para producir un producto de bajo contenido en fitato, alto contenido en proteína con excelente valor alimenticio para una diversidad de especies de animales que incluyen peces, cerdos, aves, rumiantes y animales de compañía.

## ES 2 272 476 T3

La fase líquida formada durante la deshidratación de del extracto tratado por calor, desfitinizada contendrá, principalmente, carbohidratos solubles y proteínas solubles que son resistentes a precipitación inducida por calor. El líquido se puede secar, de la forma conocida, para generar un producto proteico de energía que tendría valor como un ingrediente de alimentación para una diversidad de especies de animales que incluyen peces, cerdos, aves, rumiantes y animales de compañía.

En una realización preferida de la invención, la fase líquida formada durante la deshidratación del extracto tratado por calor, desfitinizado se fracciona adicionalmente para incrementar el valor del material. Como ejemplo de una parte de la proteína total en el extracto se puede precipitar, de la forma conocida, mediante técnicas tal como precipitación isoeléctrica. Las proteínas precipitadas después se pueden separar y secar para formar un producto de bajo contenido en fitato y alto contenido en proteína. El líquido restante después de la retirada de la proteína precipitada contendría principalmente, carbohidratos y proteínas solubles que son resistentes a la precipitación isoeléctrica inducida por calor. El material se podría secar para generar un producto con buen valor alimenticio para animales tales como cerdos y aves.

En otra realización preferida de la invención, el líquido formado durante la deshidratación del extracto tratado por calor, desfitinizado se procesa directamente durante sistemas de filtración de membrana para separar y concentrar la proteína y carbohidratos solubles constituyentes. Específicamente, un concentrado de proteínas con un contenido proteico se  $> 65\%$ , preferiblemente  $> 75\%$ , de materia seca se puede formar pasando el líquido a través de una membrana de ultrafiltración. El concentrado de proteínas formado durante la ultrafiltración se puede secar, de la manera conocida, para generar un producto proteico de alto valor. De acuerdo con la invención, el contenido en fitato de este concentrado de proteína es  $< 0,1\%$  de materia seca. En un aspecto preferido de la invención, el contenido en fitato del concentrado de proteína no es detectable. El concentrado de proteína 0-fitato, de alto contenido en proteína tiene excelente valor como ingrediente de alimentación para peces, cerdos, pollos y ganado vacuo. El concentrado de proteína tiene además potencial para uso y consumo humano como un ingrediente de alimentación.

Todavía, en otra realización preferida de la invención, el permeado formado durante la etapa de ultrafiltración se puede además procesar mediante nanofiltración, para generar un concentrado enriquecido en carbohidrato. Este concentrado de carbohidrato se puede usar directamente como un alimento energético concentrado líquido. Como alternativa, el concentrado se puede secar, de la forma conocida, y usar como un ingrediente de alimentación seco. Finalmente, existe la opción de usar el concentrado líquido directamente como materias primas en un procedimiento de fermentación para la producción de etanol.

Además en otra realización preferida de la invención, el permeado formado durante la nanofiltración se puede reciclar directamente en el medio de extracción inicial. Existe la opción de purificar el agua en el filtrado a través de ósmosis inversa y por lo tanto generar un concentrado mineral como un producto adicional.

La invención se describirá en más detalle mediante el siguiente ejemplo. El ejemplo se proporciona solamente con el fin de ilustrar la invención y no se deben considerar que restringen el alcance de la invención de ninguna manera.

### Ejemplo 1

#### *Fraccionamiento de las escamas de canola no tostadas*

Las escamas de canola extraídas con aceite cargadas con hexano se obtuvieron a partir de una instalación de compresión comercial. Este material no se había sometido a desolventización ni tostado. Las escamas se almacenan en sacos de arpillera y se mantienen en un ambiente abierto al aire durante un mínimo de de 7 días que permiten que se evapore el hexano. Las escamas desolventizadas se desmenuzan para romper las masas más grandes en las escamas.

Se mezclaron 20 kg de canola desolventizado con 60 litros de agua a  $50^{\circ}\text{C}$  en un mezclador de bandas durante un período de 10 minutos. La mezcla se pasó a través de una prensa de filtro de cinta de compresión (Frontier Technologies Incorporated). La cinta constaba de una cinta de 30 cm 350 CMF, con 9 rollos de presión y rollo dentados. El paso a través de la prensa de cinta separó la mezcla en un extracto y una torta prensada. El extracto se prensó a través de un despulpador comercial de pequeña escala equipado con un tamiz metálico de de 0,15 mm de abertura de construcción de costumbre. El despulpador retiró las partículas mayores del extracto. la pulpa se pasó a través del despulpador un segundo para mejorar la separación de las partículas mayores. La pulpa restante después del segundo paso se mezcló con el material de la torta prensada. Se añadieron 20 litros de agua a  $50^{\circ}\text{C}$  a la torta prensada y se mezcló en un mezclador de bandas hasta que se obtuvo una consistencia uniforme. Después la mezcla se pasó a través de la prensa de filtro de cinta. El extracto de este segundo pase a través de la prensa de cinta se procesó a través del despulpador como se ha descrito para el primer extracto. La pulpa restante del procesamiento y el segundo extracto se mezcló en la segunda torta de prensa. Se mezclaron 10 litros de agua a  $50^{\circ}\text{C}$  con la segunda torta de prensa en un mezclador de cinta hasta que se obtuvo una consistencia uniforme. Después la mescal se procesó a través de una prensa de tornillo de deshidratación de 6 pulgadas (15,25 cm) (Modelo CP-6) Vincent Corporation para generar un extracto y una torta de prensa. El extracto se procesó a través del despulpador como se ha descrito previamente y la pulpa se añadió a la torta de prensa obtenida del primer pase a través de la prensa de tornillo. Se mezclaron 5 l de agua a  $50^{\circ}\text{C}$  con la torta de prensa en un mezclador de bandas hasta que se obtuvo consistencia uniforme. La mezcla se pasó a través de la prensa de tornillo. El extracto se procesó a través de la despulpadita y la

## ES 2 272 476 T3

pulpa se añadió a la torta de prensa. la mezcál de la pulpa y la torta de prensa (sin adición de más agua) se procesó mediante un pase final a través de la prensa de tornillo para generar la torta de prensa final y un extracto. Todos los extractos despulpados de las diversas etapas en el procedimiento de deshidratación de extracción se reunieron y se mezclaron para generar el extracto final. Se ensayaron la proteína bruta y el contenido en materia seca del material de partida, el extracto final y la torta de prensa final. Los flujos de proteína y masa de materia se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Contenido en proteína y materia seca y flujo de masa durante la extracción - deshidratación de escamas de canola

	% de proteína bruta	% de materia seca	% de proteína bruta total	% de materia seca
Escamas de canola	39,6	90,9		
Extracto	49,3	13,4	64,3	51,7
Torta de prensa	32,8	30,0	32,7	39,1

<sup>1</sup> Contenido en proteína bruta expresado como % de materia seca.

<sup>2</sup> Contenido en proteína y materia seca de extracto y torta de prensa expresado como porcentaje de la proteína y materia seca en el material de partida de las escamas de canola

### Ejemplo 2

#### *Desfitinización de un extracto de escamas de canola*

La fitasa (Natuphos<sup>®</sup> 5000, BASF) p FFi fitasa (enziam no comercial suministrada por Finn Feeds International) se diluyó en agua de manera que una alícuota de 250  $\mu$ l era el equivalente de adición de 0, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, libera un micromol de fósforo orgánico por minuto a partir de una solución en exceso de de fitato sódico a 37°C y pH 5,5.

En un tubo de centrífuga cónico, 20 mg de escamas de canola desolventizada se mezclaron con 100 ml de NaCl al 0,75% a 50°C. La suspensión se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró y se dividió en alícuotas de 2 ml en tubos de ensayo de vidrio y se colocaron en un baño de agua a 50°C. Después de que pasaran 60 minutos, se detuvo la reacción mediante la adición de 1 ml de HCl 1 M enfriado por hielo y se agitó en un aparato Vórtex. Las muestras se dejaron en hielo para estar seguro de que la reacción se había detenido. Las muestras se analizaron para determinar fósforo soluble y la muestra de 60 minutos se analizó para determinar fitato.

El nivel de fitato en el extracto salino después de tratar con FFi y Natuphos fitasa durante 60 minutos se muestra en al figura 1. Solamente 250 unidades de o bien fitasa se requerían para completar la desfitinización de un extracto de canola a pH 5,8. La investigación anterior mostró que la desfitinización completa de una suspensión de harina de canola requiere 5000 U/kg de fitasa. El trabajo previo también muestra que la eficacia de la desfitinización se mejoró reduciendo el pH de una suspensión entre 5,0 y 5,8 pero en este estudio, incluso a pH 5,8 la reacción se produjo muy rápidamente.



## ES 2 272 476 T3

### Ejemplo 3

#### *Coagulación de proteína inducida por calor de un extracto desfitinizado de escamas de canola*

5 Se procesaron escamas de canola desolventizada no tostada mediante extracción - deshidratación como se ha descrito en los ejemplos. Sin embargo en este caso, las escamas desolventizadas se tamizaron a través de un tamiz de malla número 10 U. S. para retirar los agregados grandes a partir del material de partida.

10 El extracto final se colocó en una caldera de vapor de 100 l y la temperatura del extracto aumento hasta 50°C. Se añadió la fitasa (FFI fitasa como se ha descrito en el ejemplo 2) a la mezcla para proporcionar 1500 FTU/kg de material de partida original. La mezcla se agitó de manera continua con un agitador mecánico y la temperatura se mantuvo durante 60 minutos para afectar la desfitinización del extracto. A la conclusión del período de desfitinización la temperatura de la mezcla se incrementó hasta 95°C y esta temperatura se mantuvo durante 5 minutos. A la conclusión del período de tratamiento por calor se interrumpió el suministro de vapor a la caldera y se introdujo agua fría en las líneas. Un coágulo rico en proteínas se formó en la parte del líquido y el coágulo endurecido durante un período de enfriamiento de 20 minutos. Los contenidos enteros de la caldera se vertieron a través de un tamiz de nitex de 200 micrones de abertura. Los sólidos se atraparon en el tamiz, y el tamiz y contenidos se doblaron y se colocaron en un molde de queso. El coágulo rico en proteínas se comprimió a 5 psi (34,474 kPa) en una prensa hidráulica de quesos durante 10 minutos. La presión se incrementó hasta 10 psi (68,948 kPa) y se mantuvo durante 10 minutos. la presión se incrementó de nuevo hasta 20 psi (137,90 kPa) y se mantuvo durante otros 10 minutos. La presión se incrementó de nuevo hasta 30 psl (206,84 kPa) y se mantuvo durante otros 10 minutos. Finalmente la presión se incrementó hasta 40 psi (275,79 kPa) y se mantuvo durante 20 minutos. Las escamas de partida, torta de prensa final, coágulo rico en proteína deshidratado, y la fracción líquida del extracto deshidratado y desfitinizado tratado por calor se ensayó para determinar proteína y materia seca. Se ensayaron la proteína y el contenido en materia seca de las diversas fracciones y flujos de masa proteína y materia seca se muestran en la tabla 2.

30 **Tabla 2.** Contenido en proteína y materia seca y flujo de masa durante un procedimiento de extracción - deshidratación, seguido de tratamiento por calor y deshidratación de un extracto de escamas de canola

	% de proteína bruta <sup>1</sup>	% de materia seca	% de proteína bruta total	% de materia seca
Escamas de canola	40,7	91,4		
Extracto	49,2	11,8	58,0	48,0
Torta de prensa	33,1	28,3	31,8	39,1
Coágulo deshidratado	62,1	29,5	41,9	27,4
Líquido de la deshidratación del coágulo	35,7	7,0	16,4	18,6

<sup>1</sup> Contenido en proteína bruta expresado como % de materia seca.

<sup>2</sup> Contenido en proteína y materia seca expresado como porcentaje de la proteína y materia seca en el material de partida de las escamas de canola

## ES 2 272 476 T3

### Ejemplo 4

*Ultrafiltración de un extracto líquido obtenido durante la deshidratación de un coágulo de proteína formado por el tratamiento por calor de un extracto de canola*

5

Se obtuvo un extracto líquido mediante deshidratación de coágulo de proteína que se ha formado mediante tratamiento por calor de extracto de escamas de canola. Los procedimientos para obtener el extracto líquido eran los mismos que se han descrito en los ejemplos 1 y 3.

10

7,5 litros de líquido se mantuvieron a una temperatura constante de 45°C durante el procedimiento de filtración. El líquido se pasó a través de una membrana de ultrafiltración 1812 con un corte de peso molecular nominal de 10.000. El permeato se recogió y el concentrado retenido hasta 1,5 l. Después de la finalización de la ultrafiltración se desarrolló un total de 6 rondas de diafiltración. Para cada desarrollo, se añadieron 1,5 l de agua a 45°C al retenido y el retenido se filtró hasta un volumen de 1,5 l. El retenido final se ensayó para la determinación del contenido de proteína y materia seca. Una concentración de proteína final de 91,3% (expresado como porcentaje de materia seca) se obtuvo para el retenido.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la extracción acuosa y fraccionamiento de un material de semilla oleaginosa originado a partir de semilla de colza o canola que comprende:

(a) mezclar el material de semilla oleaginosa con una solución opaca cuyo pH es mas que 2 y menos que 12 a una concentración de 10 - 50% p/v para formar una mezcla que comprende una solución acuosa que contiene proteína extraída, pequeños fragmentos sólidos de carne de célula a partir del material de semilla oleaginosa y material fibroso,

10 (b) someter dicha mezcla a separación por medios de filtración y selección para obtener, como el filtrado, un extracto acuoso que comprende la proteína extraída y los pequeños fragmentos sólidos de carne de células, mientras que se deja un residuo de sólidos de extracción que incluye el material fibroso,

15 (c) tratar dicho extracto acuoso con una enzima rica en fitasa para obtener una fracción de extracto rica en proteína desfitinizada,

(d) precipitar una parte de la proteína en dicha fracción de extracto rica en proteína desfitinizada, y

20 (e) someter dicha fracción del extracto que contiene proteína precipitada a separación sólido líquido para obtener una fracción líquida desfitinizada que contiene proteínas solubles y una fracción de sólidos desfitinizados ricos en proteína.

25 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la solución acuosa es agua que no contiene sustancialmente ácido, base o sal.

3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en el que los fragmentos sólidos pequeños de carne de células pasan a través de aberturas de tamiz de 0,15 mm.

30 4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho residuo de sólidos de extracción se recupera de la etapa (b) como producto de fibra proteica útil.

5. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dichos sólidos y fracciones líquidas se retiran separadamente de la etapa (e) como productos proteicos útiles.

35 6. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el material de semillas oleaginosas comprende escamas desolventizadas extraídas con aceite que se originan a partir de semilla de colza o canola.

40 7. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en el que las escamas desolventizadas son escamas ligeramente tostadas.

8. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el tratamiento de fitasa en la etapa (c) se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 10 a 70°C.

45 9. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la precipitación se induce en la etapa (d) mediante calentamiento del extracto acuoso desfitinizado para inducir la floculación de la proteína contenida en el extracto.

50 10. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el extracto desfitinizado se calienta a una temperatura de al menos 80°C durante al menos 1 minuto para inducir la floculación de la proteína.

11. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende la ultrafiltración de dicho líquido obtenido en la etapa (e) para concentrar y separar parcialmente la proteína soluble de los constituyentes de menor peso molecular.

55 12. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende el secado de la fracción de sólidos obtenida en la etapa (e) para producir un concentrado de proteína de contenido alto en proteína, y de contenido bajo en fitato.

60

65

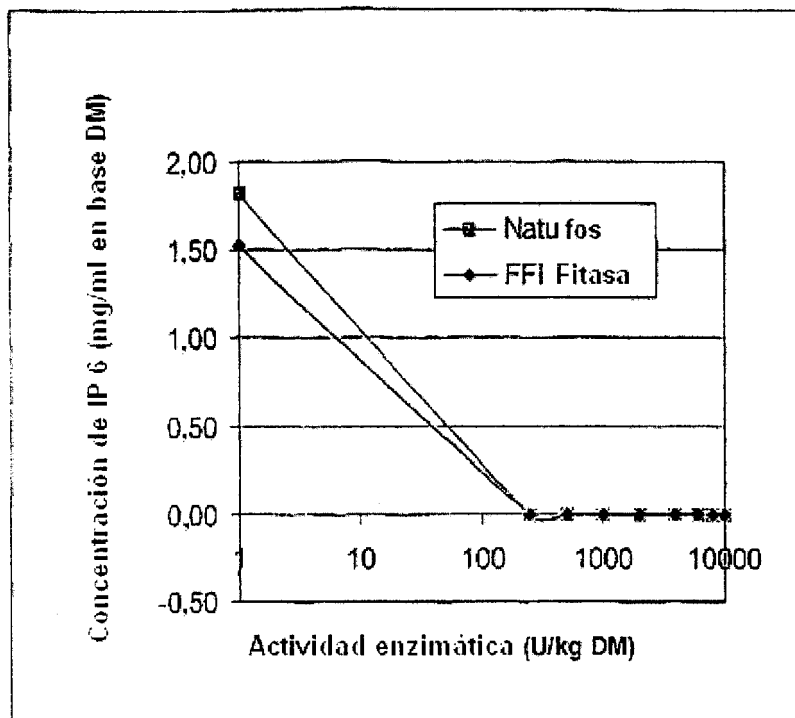


Figura 1