

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 455**

51 Int. Cl.:

**C11B 3/00** (2006.01)

**C11B 3/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2013 PCT/EP2013/053199**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13121047**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2013 E 13705756 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2814924**

54 Título: **Procedimiento para la desmucilaginación enzimática de aceite**

30 Prioridad:

**17.02.2012 DE 102012003031**

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

**19.07.2018**

73 Titular/es:

**CLARIANT PRODUKTE (DEUTSCHLAND) GMBH  
(100.0%)  
Lenbachplatz 6  
80333 München, DE**

72 Inventor/es:

**SOHLING, ULRICH;  
BUBENHEIM, PAUL y  
SUCK, KIRSTIN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 676 455 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).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la desmucilaginación enzimática de aceite

La invención se refiere a un procedimiento para la desmucilaginación de aceite vegetal bruto en fases acuosas, que comprende las etapas de la puesta en contacto del aceite vegetal bruto con una composición que comprende una enzima disociadora de fosfolípidos y una  $\alpha$ -amilasa y la separación de las mucinas, en el que el aceite vegetal bruto se pone en contacto con agua y/o ácido antes de la puesta en contacto con la composición, pero antes de la puesta en contacto con la composición no tiene lugar una separación de la fase acuosa.

Los aceites brutos contienen fosfátidos, sustancias con contenido en proteínas e hidratos de carbono, mucinas vegetales, así como compuestos coloidales, que reducen fuertemente la durabilidad del aceite. Por lo tanto, estas sustancias deben ser eliminadas.

Por fase mucilaginosa / mucinas se entiende aquí en el texto siguiente todo el grupo de estas sustancias que, después del tratamiento con una solución con contenido en ácidos y/o acuosa, precipitan del aceite en forma de una fase pesada (Bokisch, M. Nahrungsfette und -öle, Handbuch der Lebensmittel-Technologie, Ulmer Verlag, 342-433).

Por la refinación de aceites vegetales se entiende la separación de las sustancias acompañantes indeseadas. Se diferencia entre refinación química y física. La refinación química se compone de los procesos 1. desmucilaginación, 2. neutralización, 3. blanqueo, 4. desodorización. En el caso de la desmucilaginación se separan del aceite fosfolípidos e iones de metales. La neutralización sirve para la extracción de los ácidos grasos. En el caso del blanqueo, se separan los colorantes, iones de metales adicionales y mucinas restantes. En el caso de la desodorización se trata de una destilación con vapor de agua, en la que se separan otros compuestos que perjudican el olor y el sabor del aceite. En el caso de la refinación física, la desacidificación se lleva a cabo junto con la desodorización al final del proceso de refinación.

La desmucilaginación de los aceites puede tener lugar mediante extracción de los fosfolípidos con agua o una solución acuosa de un ácido, que forma complejos con iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  tales como, p. ej., ácido cítrico o ácido fosfórico. A menudo, en este caso se lleva a cabo primero una denominada pre-desmucilaginación acuosa con la que se separan los fosfolípidos solubles en agua.

En este caso se habla de fosfolípidos hidratables. La temática de los fosfolípidos hidratables y no hidratables se describe, por ejemplo, en Nielsen, K., Composition of difficultly extractable soy bean phosphatides, J. Am. Oil. Chem. Soc. 1960, 37, 217-219 y A.J. Dijkstra, Enzymatic degumming, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010, 112, 1178-1189. En este caso, se trata en particular, de fosfatidil-colina y fosfatidil-inositol. El tratamiento con ácidos acuosos diluidos complejantes de calcio y magnesio tales como, p. ej., ácido cítrico o ácido fosfórico, conduce según el estado de la técnica, a que fosfolípidos no hidratables sean transformados en fosfolípidos hidratables. Se parte del hecho de que el mecanismo de esta reacción se basa en que del aceite se separan iones calcio que puentean y estabilizan diferentes moléculas de fosfolípidos tales como, p. ej., ácidos fosfatídicos en los grupos fosfato. Esto conduce a la extracción mejorada de estos fosfolípidos con agua. Ciertamente, mediante la pre-desmucilaginación acuosa y el tratamiento con ácidos acuosos en el caso de algunos aceites tales como, p. ej., aceite de palma, se alcanza una desmucilaginación suficientemente buena, para otros tipos de aceites vegetales tales como, p. ej., aceite de cáñola, aceite de colza o aceite de soja, estas dos etapas de extracción conducen muy a menudo a una reducción insuficiente de las mucinas. Habitualmente, en este caso se desea una reducción del contenido de fósforo a 10 o menos ppm de fósforo en el aceite para aplicaciones en alimentos (según el estado de la técnica determinado mediante análisis ICP/AES del aceite). Requisitos más rigurosos se aplican al contenido en fósforo del aceite cuando los aceites se emplean, por ejemplo, para la preparación de biodiesel. Allí, según la norma EU, el contenido en fósforo del biodiesel está limitado a 5 ppm y es conveniente llevar a cabo ya en el lado del aceite la reducción de fósforo. Además, un contenido en fósforo particularmente bajo, es decir, un contenido en fósforo que es lo más bajo posible y en la medida de lo posible asciende a 0, es necesario cuando los aceites en etapas de tratamiento adicionales se hidratan para el empleo en alimentos, es decir, ácidos grasos insaturados se transforman en saturados o cuando según el proceso NExBTL de la razón social Neste se lleva a cabo una hidrogenación de modo que como producto final se obtienen alcanos, es decir, un combustible de biodiesel convencional, pero preparado a partir de aceite vegetal. Estos procesos establecen, como ya se ha indicado anteriormente, requisitos extremadamente elevados a un bajo contenido en fósforo en el aceite, y el empleo de procesos de este tipo aumentará en la medida en que los aceites vegetales se empleen como materias primas para la industria química.

Otra variante la representa la denominada "caustic refining" (refinación cáustica). Este procedimiento se emplea con el fin de eliminar del aceite, en la medida de lo posible, todos los fosfolípidos junto con ácidos grasos libres. Este proceso se describe, por ejemplo, en el documento WO 08/094847 de la razón social Bunge. En el caso de este procedimiento, el aceite bruto o pre-desmucilaginado con agua se mezcla primeramente con pequeñas cantidades de ácido cítrico o ácido fosfórico y se agita intensamente. En este caso, tal como ya se ha explicado anteriormente, sales de fosfolípidos no hidratables se hacen más intensamente hidratables. Después se añade lejía de sosa diluida, calculándose la cantidad de manera que se obtiene un escaso exceso frente a la cantidad requerida para la neutralización del ácido graso libre. Con ello, se forman las sales de ácidos grasos. Mediante deposición y subsiguiente centrifugación, la mezcla se separa entonces y se obtiene una solución acuosa de ácidos grasos como

residuo en la que se encuentran también los fosfolípidos. El aceite es lavado entonces seguidamente de nuevo con agua reblandecida. El tratamiento con NaOH tiene el inconveniente de que, en parte, se manifiesta también una saponificación del aceite, con lo cual se reduce su rendimiento.

5 Según el estado de la técnica, una reducción adicional del contenido en fósforo en un aceite se puede conseguir llevando a cabo un tratamiento con adsorbente con una tierra decolorante o un gel de sílice especial o desmucilaginando enzimáticamente los aceites vegetales. El tratamiento con adsorbente presenta el inconveniente de que después del tratamiento con adsorbente queda en el adsorbente aceite vegetal que reduce el rendimiento en aceite de todo el proceso de refinación. Además, la tierra decolorante usada representa un “residuo” para el cual se han de encontrar posibilidades de desecho.

10 Otro inconveniente de los procesos convencionales de desmucilaginación de aceite estriba en que tanto la pre-desmucilaginación acuosa como el tratamiento con ácidos acuosos conducen a pérdidas del aceite que son provocadas porque los fosfolípidos transferidos al agua representan emulsionantes que emulsionan una parte ciertamente pequeña, pero considerable del aceite vegetal en la fase acuosa, con lo cual se pierde aceite vegetal. Estas pérdidas pueden encontrarse en el intervalo de unos pocos porcentajes referido al aceite bruto originalmente empleado. Como regla general se cumple que con en cada caso dos moléculas de fosfolípido se emulsiona aproximadamente una molécula de triglicéridos (descrito en el documento WO 08/094847).

15 La denominada desmucilaginación enzimática evita varios inconvenientes de los procedimientos existentes o bien mejora adicionalmente los procesos de extracción. Así, no resulta residuo adicional alguno tal como en el caso del empleo de adsorbentes, y se demostró que en el caso de la desmucilaginación enzimática pueden continuar reduciéndose las pérdidas de aceite.

La denominada desmucilaginación enzimática se realiza en el estado de la técnica mediante el empleo de fosfolipasas, en particular fosfolipasa A1 y A2 o fosfolipasa C o una combinación de fosfolipasas.

Las fosfolipasas son enzimas que pertenecen al grupo de las hidrolasas que hidrolizan el enlace éster de fosfolípidos. Las fosfolipasas se dividen según su regioselectividad en fosfolípidos en 5 grupos:

25 Fosfolipasas A1 (PLA<sub>1</sub>), que disocian el ácido graso en la posición *sn1* bajo la formación del 2-lisofosfolípido.

Fosfolipasas A2 (PLA<sub>2</sub>), que disocian el ácido graso en la posición *sn2* bajo formación del 1-lisofosfolípido

Fosfolipasas C (PLC), que disocian un monéster de ácido fosfórico.

Fosfolipasas D (PLD), que disocian o intercambian el grupo de cabeza.

30 Fosfolipasas B (PLB), que disocian el ácido graso tanto en la posición *sn1* como en la posición *sn2* bajo formación de un 1,2-lisofosfolípido.

Estas reacciones tienen lugar siempre en la superficie límite de sustratos agregados.

35 El uso de fosfolipasas, ante todo fosfolipasa A, para la desmucilaginación de aceites brutos está protegido, por ejemplo, en el documento EP 0513709 B1 (el denominado proceso Enzymax de la razón social Lurgi, Frankfurt). Se parte del hecho de que la disociación de un ácido graso conduce a una lisolecitina que tiene una capacidad de emulsión esencialmente menor para el aceite y posee también una solubilidad en agua esencialmente mayor. Con ello, se aumenta tanto el rendimiento del aceite como se mejora la solubilidad en agua de los fosfolípidos difícilmente hidratables. El artículo de Clausen, Enzymatic oil-degumming by novel microbial phospholipase, Eur. J. Lipid. Sci. Technol. 103 (2001) 333-340, describe el desarrollo y el empleo de una fosfolipasa A1 para la desmucilaginación enzimática de aceite y compara el empleo de la fosfolipasa A1 con el empleo de la fosfolipasa A2. El estado actual de la técnica para la desmucilaginación enzimática de aceite se recopila en los dos Artículos de A.J. Dijkstra, Recent developments in edible oil processing, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2009, 111, 857-864, y el Artículo de A.J. Dijkstra, Enzymatic degumming, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010, 112, 1178-1189. Allí, se discuten las ventajas y desventajas de las distintas fosfolipasas para la desmucilaginación enzimática de aceite y se indican también los métodos de tratamiento previo con diferentes ácidos.

45 El documento WO 2012079663 describe un procedimiento para la degradación enzimática de compuestos con contenido en fósforo y glicósidos, en particular, esterilglicósidos a partir de aceite bruto o aceite desmucilaginado de origen vegetal o animal, llevándose a cabo la adición de las fosfolipasas y glucosidasas en una etapa.

50 Un concepto alternativo para la desmucilaginación de aceite lo representan los sistemas de la razón social Danisco, en los que se emplea una lipídaciltransferasa. Esta enzima produce a partir de un fosfolípido asimismo un lisofosfolípido, pero transfiere el resto ácido graso a un esteroles en la fase oleosa. Las correspondientes enzimas y los procedimientos de empleo de estas enzimas se describen en el documento WO 2006/008508 y el documento WO 2009/081094.

Desde el punto de vista del rendimiento de aceite sería lo más favorable para la desmucilaginación enzimática

emplear una fosfolipasa C muy eficaz que proporcione como producto un diglicérido que sea soluble en el aceite y un resto fosfatidilo, tal como, p. ej., fosfatidil-colina (partiendo de lecitina), que sea muy bien soluble en agua. Enzimas de este tipo las ha descrito la razón social Verenium en el documento US 7.226.771. En el Artículo de revisión de Dijkstra con respecto al tema "Enzymatic degumming" (desmucilaginación enzimática) se indica como inconveniente de este sistema que no convierte todos los fosfolípidos, sino únicamente lecitinas, es decir, fosfatidil-colina y fosfatidil-inositol, mientras que las etanolaminas difícilmente hidratables y los ácidos fosfatídicos permanecen sin tocar. Este inconveniente ha conducido a que en desarrollos posteriores la fosfolipasa C haya sido combinada con fosfolipasas A o con lipidaciltransferasas. En el documento WO 08/094847 se describe una combinación de fosfolipasas A con fosfolipasas C para la desmucilaginación de aceite. En este documento de patente se indica que la mezcla de fosfolipasa A y fosfolipasa C conduce, por una parte, a un efecto sinérgico del rendimiento de aceite, por otra parte, con ello se pueden ajustar contenidos en fósforo muy bajos en el aceite con tiempos de reacción compatibles.

La combinación de fosfolipasa C con lipidaciltransferasas se describe en el documento WO 2009/081094. También aquí se indica que la combinación de la aciltransferasa con la fosfolipasa C conduce a un aumento del rendimiento de aceite.

Otra variante de la desmucilaginación enzimática de aceite lo representa el tratamiento enzimático de la fase mucilaginosa separada después de que el aceite haya sido desmucilaginado según procedimientos convencionales tales como, p. ej., con agua y/o ácido cítrico. Mediante este tratamiento es posible recuperar una parte del aceite vegetal emulsionado en la fase mucilaginosa. Este proceso se discute, por ejemplo, también en el Artículo de revisión A.J. Dijkstra, Enzymatic degumming, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010, 112, 1179-1189, pág. 1184. Procedimientos correspondientes se describen también en los siguientes documentos de patente.

El documento EP 01 624 047 describe una recuperación de aceite a partir de mucílago mediante el empleo de agentes fosfolipolíticos, pudiendo ser los agentes fosfolipolíticos tanto ácidos como fosfolipasas. El documento WO 2009/081094 describe, junto a los aspectos arriba indicados, también el tratamiento enzimático de la fase mucilaginosa separada con aciltransferasa y mezclas a base de aciltransferasa y fosfolipasa C.

El documento WO 2009/088980 describe un tratamiento enzimático del "mucílago" con fosfolipasa C y fosfolipasa A.

El aspecto de la sostenibilidad del empleo de fosfolipasas frente a otros métodos de desmucilaginación se describe finalmente en el Artículo L. De Maria y J. Vind y K. M. Oxenbøll y A. Svendsen y S. Patkar, Phospholipases and their industrial applications, Appl Microbiol Biotechnol (2007) 74:290-300 págs. 96 y 97. En el ejemplo de un molino de aceite que fue transformado de un proceso convencional de desmucilaginación en un proceso con fosfolipasa A y en el que por año se purifican 266.000 t de aceite de soja, se demostró que allí se pueden ahorrar al año 120000 GJ de energía y 12000 t de equivalentes de CO<sub>2</sub>. Los equivalentes de CO<sub>2</sub> ahorrados corresponden a las emisiones de un promedio de 1600 habitantes de la Tierra.

En virtud del aumento mundial del consumo de aceite de mesa y del aprovechamiento cada vez más intenso de aceites vegetales como materias primas para la industria química y como combustible existe una demanda adicional continua de mejorar adicionalmente la desmucilaginación de aceites vegetales y, en particular, la desmucilaginación enzimática de aceites vegetales. Los autores de la presente solicitud se han planteado, por lo tanto, la misión de desarrollar composiciones para la desmucilaginación enzimática con las cuales se continúe reduciendo el contenido en fósforo del aceite a desmucilaginar, se reduzcan las pérdidas de aceite y/o se aumenten las velocidades de reacción de la desmucilaginación enzimática. Al mismo tiempo, estas composiciones deben posibilitar, además, también una realización rentable del procedimiento a escala industrial.

Este problema se resolvió mediante un procedimiento para reducir la emulsionabilidad de aceite vegetal en fases acuosas, que comprende las siguientes etapas:

a) puesta en contacto del aceite vegetal bruto con una composición que comprende un primer componente enzimático que comprende al menos una enzima disociadora de fosfolípidos, así como un segundo componente enzimático que comprende al menos una enzima no disociadora de fosfolípidos, tratándose del segundo componente enzimático de una  $\alpha$ -amilasa;

b) separación de las mucinas del aceite vegetal,

en el que antes de la puesta en contacto conforme a la etapa a), el aceite vegetal bruto se pone en contacto con agua y/o ácido, pero antes de la etapa a) no tiene lugar separación alguna de la fase acuosa, sino que el aceite bruto pre-acondicionado se emplea directamente en la etapa a).

Por la expresión "primer componente enzimático" se entiende en este caso en el sentido de la presente invención toda composición que contenga o bien se componga de al menos una enzima disociadora de fosfolípidos.

En el caso de la "enzima disociadora de fosfolípidos" se puede tratar de una fosfolipasa que está en condiciones de disociar de un fosfolípido un resto ácido graso o un resto fosfatidilo o un grupo de cabeza. Además, también se

puede tratar de una denominada aciltransferasa, en la que la disociación del resto ácido graso esté ligada con una transferencia de este resto, seguido de una formación del éster, con un esteroles libre en la fase oleosa.

En una forma de realización preferida, se emplea una composición en la que el primer componente enzimático se elige del grupo consistente en fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa C, fosfolipasa B, fosfolipasa D y aciltransferasa. Enzimas típicas de este grupo que se encuentran en el mercado son la Lecitase® Ultra de Novozymes®, una fosfolipasa A1, Lecitinase® de Novozymes, una fosfolipasa A2, Rohalase® MPL, una fosfolipasa A2 de AB Enzymes, Darmstadt (D), Purifine®, una fosfolipasa C de Elementis, San Diego, EE.UU, Lysomax®, aciltransferasa de la razón social Danisco. En este caso, dentro del primer componente enzimático puede emplearse también una combinación a base de dos o más de las enzimas disociadoras de fosfolípidos antes mencionadas. En este caso, las enzimas pueden proceder de un organismo arbitrario (p. ej., también aislado de un organismo termófilo) o de una fuente sintética. En el marco de la presente invención es también posible que dentro del primer componente enzimático se empleen enzimas del mismo tipo, pero que procedan de diferentes fuentes o bien especies. Asimismo, quedan abarcadas proteínas de fusión quiméricas, preparadas de forma recombinante a partir de dos o varias especies diferentes con actividad enzimática.

Por la expresión “segundo componente enzimático” se entiende en este caso en el sentido de la presente invención una  $\alpha$ -amilasa.

La  $\alpha$ -amilasa puede proceder en este caso de un organismo arbitrario (p. ej., también aislado de un organismo termófilo) o de una fuente sintética. En el marco de la presente invención es también posible que dentro del segundo componente enzimático se empleen  $\alpha$ -amilasas que procedan, sin embargo, de diferentes fuentes o bien especies. Asimismo, quedan abarcadas proteínas de fusión quiméricas de dos o varias especies diferentes con actividad enzimática, preparadas de forma recombinante.

El procedimiento se emplea para la desmucilagínación de aceites vegetales o bien la reducción de la emulsionabilidad de aceites vegetales en fases acuosas.

Por el término “pre-desmucilagínación” o bien la expresión “desmucilagínación en húmedo” se entiende un tratamiento del aceite bruto con agua o una solución acuosa de ácidos, con el fin de eliminar del aceite lo más ampliamente posible fosfolípidos hidrosolubles. También en el marco de una pre-desmucilagínación o bien desmucilagínación en húmedo, después de la adición del ácido puede tener lugar eventualmente una adición de álcalis con el fin de neutralizar al ácido. Antes de la adición de la enzima tiene lugar la separación de la fase acuosa. Después de una pre-desmucilagínación, el contenido de fósforo en el aceite bruto se reduce de aprox. 500-1500 ppm, p. ej., para soja y colza, a menos de 200 ppm en aceite pre-desmucilagínado. Mediante la desmucilagínación puede obtenerse, p. ej., lecitina a partir de la fase mucilagínosa resultante o bien la fase mucilagínosa puede elaborarse como pienso. El inconveniente de la separación de la fase acuosa o bien de la reducción del contenido de fósforo es, sin embargo, una pérdida de rendimiento en relación con el aceite. Los fosfátidos que se transfieren a la fase acuosa actúan de forma emulsionante y conducen a que una parte del aceite se emulsione en la fase acuosa y se separe con ésta. A continuación, el aceite puede continuar tratándose ulteriormente de modo enzimático (debiendo separarse las enzimas en una etapa ulterior).

Por el término “pre-acondicionamiento” del aceite se entiende en la siguiente solicitud la adición de agua o bien de una solución acuosa de ácido al aceite bruto no tratado. A continuación, mediante la adición de álcalis, p. ej., lejía de sosa, se ajusta un valor del pH en el que tiene lugar la siguiente reacción enzimática. De manera ideal, se ajusta el valor de pH óptimo para la reacción enzimática. Éste es para las enzimas disociadoras de fosfolípidos un valor del pH de 4-5. A continuación no tiene lugar, sin embargo, separación alguna de la fase acuosa, sino inmediatamente la adición de las enzimas. Las mucinas presentes permanecen, por lo tanto, primero en el aceite o bien en la emulsión. La separación de la fase acuosa y, con ello, de las enzimas tiene lugar sólo después de la acción de las enzimas sobre el aceite bruto (eventualmente pre-acondicionado).

La adición de agua o bien de una solución acuosa de ácido y eventualmente de álcalis para la neutralización del ácido al aceite bruto tiene lugar en el sentido de un pre-acondicionamiento, pero se suprime la separación de la fase acuosa antes de la adición de las enzimas (en el sentido de una pre-desmucilagínación en húmedo). Mediante la renuncia a una etapa de separación antes de la adición de las enzimas es posible un aumento del rendimiento de aceite. Un aumento del rendimiento de aceite en un punto porcentual tiene una enorme importancia industrial, dado que este porcentaje corresponde a aprox. 400.000 t de aceite, referido a la producción anual de aceite de soja. El procedimiento de acuerdo con la invención permite, por consiguiente, el uso inmediato de aceites brutos de soja o bien colza con contenidos en fósforo de 500 a 1.500 ppm de fósforo. Además, representa una simplificación del procedimiento, dado que se suprime la etapa de separación antes de la adición de la enzima.

En el caso de la adición de agua se ha de tener en cuenta lo siguiente: con el fin de eliminar del aceite los fosfátidos se requiere aprox. un 1% en vol. de agua, referido al volumen de aceite, con el fin de eliminar aprox. 400 ppm de fósforo. Según esta consideración, la adición de aprox. 5% en vol. de agua, referido al volumen de aceite, es suficiente con el fin de liberar por completo de fósforo a un aceite con un contenido elevado en fósforo. No obstante, un modo de proceder de este tipo conduce a que el procedimiento no sea rentable, ya que siempre se han de facilitar grandes volúmenes de reacción. Además de ello, un volumen de agua añadido grande condiciona una

elevada complejidad de separación y un menor rendimiento de aceite, menos agua añadida significa, por consiguiente, también un mayor rendimiento de aceite. Por lo tanto, en general, no se han de añadir al aceite más de 4% en vol. de agua, preferiblemente no más de 3% en vol. de agua, en cada caso referido al volumen de aceite.

5 En una forma de realización preferida adicional, no se añaden en la etapa de refinación - independientemente de los emulsionantes ya presentes en el aceite tales como, p. ej., lecitina - emulsionantes adicionales tales como, p. ej., dodecilsulfato sódico (SDS). Asimismo, el procedimiento de acuerdo con la invención se contenta preferiblemente sin la adición de sales tales como, p. ej., cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ).

10 En una forma de realización preferida, la actividad enzimática de la o las enzimas del primer componente enzimático se elige en el intervalo de 0,01 a 6 unidades/g de aceite, preferiblemente en el intervalo de 0,1 a 3 unidades/g de aceite, de manera particularmente preferida en el intervalo de 0,2 a 2,5 unidades/g de aceite y lo más preferiblemente en el intervalo de 0,3 a 1 unidades/g de aceite. En una forma de realización preferida adicional, la actividad enzimática del segundo componente enzimático se elige en el intervalo de 0,01 a 6 unidades/g de aceite, preferiblemente de 0,1 a 3 unidades/g de aceite y de manera particularmente preferida en el intervalo de 0,2 a 2,5 unidades/g de aceite y lo más preferiblemente en el intervalo de 0,3 a 1 unidades/g de aceite. (Unidad: unidad internacional para la actividad enzimática; 1 unidad corresponde a la conversión de sustrato de 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$ ).

15 Es particularmente preferido en el marco de la presente invención emplear composiciones en las que la relación de la actividad enzimática del primer componente enzimático a la actividad enzimática del segundo componente enzimático se encuentre en el intervalo de 0,01 : 6 unidades/g de aceite a 6 : 0,01 unidades/g de aceite, preferiblemente en el intervalo de 0,1 : 3 unidades/g de aceite a 3 : 0,1 unidades/g de aceite. En este caso, se prefiere también que la proporción del primer componente enzimático y la proporción del segundo componente enzimático sean iguales, por ejemplo, ambas proporciones se eligen en el intervalo de 0,1 a 0,5 unidades/g de aceite, preferiblemente en el intervalo de 0,2 a 0,3 unidades/g de aceite.

Manteniendo la relación de acuerdo con la invención con la enzima disociadora de fosfolípidos a  $\alpha$ -amilasa se puede reducir el volumen de la fase mucilaginosa. Esto significa un aumento del rendimiento de aceite.

25 Las enzimas del primer y/o segundo componente enzimático pueden, por ejemplo, liofilizarse en este caso y utilizarse disueltas en el correspondiente tampón enzimático (tampones convencionales para cada una de las enzimas están descritos en la bibliografía), p. ej., tampón citrato 0,1 M, pH 5 o tampón acetato 0,1 M, pH 5. En una forma de realización preferida, las enzimas se recogen en tampón enzimático y se añaden al aceite bruto. Con el fin de alcanzar una mejor solubilidad de las enzimas - en particular en las mezclas con contenido en fosfolípidos - también es posible la adición de disolventes orgánicos. Estos encuentran aplicación, p. ej., en la separación de los fosfolípidos y se describen en la bibliografía. Se utilizan preferiblemente disolventes orgánicos no polares tales como, p. ej., hexano o acetona o mezclas, preferiblemente en una cantidad de 1 a 30% en peso (ejemplos de posibles disolventes se describen en el documento EP 1531182 A2).

35 En otra forma de realización preferida, el primer y/o segundo componente enzimático, se emplean en forma soportada. Dado que, en particular, las enzimas disociadoras de fosfolípidos son enzimas especiales, cuyo precio, medido en comparación con enzimas a granel tales como, p. ej., enzimas degradantes de hidratos de carbono (amilasas, glucosidasas) es relativamente elevado, en el marco de la presente invención se prefiere que al menos la o las enzimas disociadoras de fosfolípidos de la composición se emplee o empleen en forma soportada. Materiales de soporte preferidos en el marco de la presente invención son materiales de soportes inorgánicos tales como, p. ej., geles de sílice, ácidos silícicos de precipitación, silicatos o aluminosilicatos, y materiales de soporte orgánicos tales como, p. ej., metacrilatos o resinas de intercambio iónico. Los materiales de soporte facilitan la capacidad de reutilización de las enzimas (relativamente costosas) a partir de la emulsión de aceite en agua en una siguiente etapa del procedimiento y cooperan en la rentabilidad de éste.

45 En una forma de realización asimismo preferida, el primer y/o segundo componente enzimático comprende uno o varios elementos adicionales, elegidos de manera particularmente preferida del grupo consistente en tampón citrato y tampón acetato.

50 En formas de realización particularmente preferidas, que no limitan de modo alguno el marco de la presente invención, el primer componente enzimático comprende al menos una enzima, elegida del grupo consistente en fosfolipasa A1, fosfolipasa A2 y fosfolipasa C, y en el caso del segundo componente enzimático se trata de alfa-amilasa, tratándose de manera particularmente preferida de enzimas liofilizadas que se presentan en un tampón elegido del grupo consistente en tampón citrato o tampón acetato. Lo más preferido es, además, que al menos la enzima del primer componente enzimático se presente unida por adsorción o de forma covalente a un soporte que se elige preferiblemente del grupo consistente en materiales de soporte inorgánicos tales como, p. ej., geles de sílice, ácidos silícicos de precipitación, silicatos o aluminosilicatos, y materiales de soporte orgánicos tales como, p. ej., metacrilatos o resinas de intercambio iónico. Asimismo es preferido en el caso de esta forma de realización particularmente preferida que la relación de la actividad enzimática del primer componente enzimático a la actividad enzimática del segundo componente enzimático se encuentre en el intervalo de 0,01 : 6 unidades/g de aceite a 6 : 0,1 unidades/g de aceite, preferiblemente en el intervalo de 0,1 : 3 unidades/g de aceite a 3 : 0,1 unidades/g de aceite. En este caso, se prefiere también que la proporción del primer componente enzimático y la proporción del

segundo componente enzimático sean iguales, por ejemplo, ambas proporciones se eligen en el intervalo de 0,1 a 0,5 unidades/g de aceite, preferiblemente en el intervalo de 0,2 a 0,3 unidades/g de aceite.

Los autores del presente procedimiento han encontrado, sorprendentemente, que una combinación de los componentes enzimáticos precedentemente definidos (primer y segundo componente enzimático) reduce de manera particularmente eficaz y efectiva la emulsionabilidad de aceite vegetal en fases acuosas. En este caso, el procedimiento de acuerdo con la invención se puede emplear de manera particularmente ventajosa para la desmucilagínación de aceite vegetal bruto o también para el tratamiento de mucílago de aceite vegetal. La fase mucilagínosa puede obtenerse en este caso, por ejemplo, mediante un procedimiento de desmucilagínación habitual (tal como se describe asimismo en el marco de la solicitud) o mediante el procedimiento de acuerdo con la invención cuando se emplee para la desmucilagínación de aceite vegetal bruto.

La presente invención se refiere a un procedimiento para reducir la emulsionabilidad de aceite vegetal en fases acuosas.

De manera sorprendente, se encontró en este caso que se consigue, mediante la combinación de enzima o enzimas disociadoras de fosfolípidos del primer componente enzimático con  $\alpha$ -amilasa del segundo componente enzimático, continuar reduciendo el contenido en fosfolípidos del aceite bruto con respecto al empleo puro de enzima disociadora de fosfolípidos, aumentar el rendimiento de aceite, aumentar la velocidad de reacción en el caso de la desmucilagínación enzimática, reducir el volumen de mucílago y/o mejorar la capacidad de separación de la fase mucilagínosa formada.

El procedimiento de la presente invención es en este caso particularmente ventajoso, ya que mediante el empleo de otro componente enzimático (segundo componente enzimático), del que se trata de  $\alpha$ -amilasa, puede tener lugar la disociación de otros componentes que estén presentes en la fase mucilagínosa y, por consiguiente, se mejore el efecto de la enzima disociadora de fosfolípidos. Mediante el empleo del segundo componente enzimático puede alcanzarse, por ejemplo, una reducción de la viscosidad de la fase mucilagínosa de aceite, un aumento de la movilidad de los fosfolípidos como consecuencia de la disociación de componentes perturbadores o una mejor accesibilidad de los fosfolípidos. También, probablemente, se aumenta la accesibilidad de moléculas de fosfolípido de este tipo para la enzima disociadora de fosfolípidos que se encuentran en la superficie límite de la fase mucilagínosa/aceite.

Por ejemplo, mediante el empleo de glicosidasas se pueden disociar glicolípidos. La clase de los glicolípidos comprende una pluralidad de compuestos. Conforme a la bibliografía, en la fase mucilagínosa o bien en fosfolípidos vegetales están contenidos, sin embargo, ante todas las cosas, estearilglicósidos, cerebrósidos y lípidos de galactosilo (Selmair, P.L., Koehler, P. en *Molecular Structure and Baking Performance of Individual Glycolipid Classes from Lecithins*, J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 5597-5609). Así, por ejemplo, se demostró que lecitina de soja desprovista de grasa contiene hasta 10% de glicolípidos. Esto se describe también en otra cita bibliográfica, a saber, en Bueschelberger, H.G., *Lecithins, Emulsifiers in Food Technology*, Whitehurst, R.J., Ed.; Blackwell Publishing: Oxford, Reino Unido, 2004; págs. 1-10, al igual que también de Clayton, T.A., *Identification of wheat flour lipids by thin-layer chromatography*, J. Chromatogr. 1970, 47, 277-281. En otro lugar de Pardun, H., Ed.; Verlag für chemische Industrie H. Ziolkowsky KG: Augsburg, Alemania, 1988; págs. 195-202, se indica un intervalo de 6,5 a 11%. Se supone que la disociación de estas moléculas en un radical polar y un grupo de cabeza hidrosoluble, que se puede eventualmente disolver de nuevo en aceite, coopera en que los fosfolípidos se presenten en forma concentrada en las micelas de la fase mucilagínosa y, por ello, puedan ser transformadas más rápidamente por las fosfolipasas. Esta misma consideración es válida para fosfolípidos en la superficie límite aceite/mucílago.

La capacidad de emulsión reducida de los lípidos de la fase mucilagínosa después del tratamiento con las enzimas disociadoras de glicósidos coopera, además, en que el rendimiento de aceite pueda ser aumentado adicionalmente. El efecto de las enzimas disociadoras de polisacáridos y componentes de la pared celular puede explicarse debido a que los fosfolípidos son mejor accesibles para las fosfolipasas y a que, eventualmente, también aumenta la velocidad de la reacción. La presencia de los hidratos de carbono se confirma mediante análisis de lecitina de soja tal como se publica, p. ej., por Scholfield, C.R., *Composition of Soybean Lecitin*, JAOCS, vol. 58, nº 10 (octubre de 1981), págs. 889-892, que la lecitina bruta contiene también hidratos de carbono.

Así, por ejemplo, pectinas de la pared celular y polisacáridos en parte y otros componentes de la pared celular actúan de forma intensamente espesante. El aumento de la viscosidad provocada por ello puede reducir, bajo determinadas circunstancias, la velocidad de reacción de fosfolipasas. Mediante la disociación de estos componentes de la pared celular y/o de los polisacáridos en fragmentos bien hidrosolubles y que no aumentan la viscosidad puede explicarse el efecto de las enzimas añadidas sobre la eficacia de fosfolipasas.

Mediante la combinación de acuerdo con la invención de enzimas disociadoras de fosfolípidos con  $\alpha$ -amilasa es posible reducir la dosificación de las enzimas disociadoras de fosfolípidos tal como, p. ej., de la fosfolipasa A1 o A2, eventualmente combinada con fosfolipasa C y, de esta forma, ahorrar también costos junto a las ventajas arriba indicadas para el proceso. La  $\alpha$ -amilasa, que se combina con las enzimas disociadoras de fosfolípidos, es por norma general una enzima más económica que, por ejemplo, fosfolipasas y se puede adquirir en grandes cantidades. En combinación con una realización ventajosa de la reacción, es decir, condiciones de proceso que se establecen en

cada caso a las enzimas utilizadas, puede continuar mejorándose el procedimiento de acuerdo con la invención en relación con la duración así como con el consumo de energía y de materias primas.

De acuerdo con la invención, se utilizan preferiblemente: **fosfolipasa A<sub>1</sub>**, que procede de *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Pseudomonas*, páncreas de cerdo o páncreas de ganado bovino; y/o independientemente, **fosfolipasa A<sub>2</sub>**, que procede de páncreas de cerdo, páncreas de ganado bovino, *Streptomyces violaceoruber*, *Naja mossambica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* o especies de *Pseudomonas*; y/o independientemente **fosfolipasa C**, que procede de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus* o especies de *Pseudomonas*; y/o independientemente **fosfolipasa B**, que procede de *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Pseudomonas*, páncreas de cerdo o páncreas de ganado bovino.

Particularmente preferidas son fosfolipasa A<sub>1</sub> de *Thermomyces lanuginosus* o *Fusarium oxysporium* y/o independientemente, fosfolipasa A<sub>2</sub> de páncreas de cerdo, páncreas de ganado bovino, *Streptomyces violaceoruber* o *Naja mossambica*, y/o independientemente fosfolipasa C de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* o *Listeria monocytogenes*.

En relación con las  $\alpha$ -amilasas se prefieren aquellas que disocian enlaces  $\alpha(1-4)$ glicosídicos,  $\alpha(1-2)$ glicosídicos,  $\alpha(1-6)$ glicosídicos),  $\beta(1-3)$ glicosídicos,  $\beta(1-4)$ glicosídicos y/o  $\beta(1-6)$ glicosídicos.

En relación con las amilasas se prefieren aquellas de *Bacillus* o bien *Pseudomonas* o bien especies fúngicas o bien de páncreas, en particular aquellas de *Bacillus* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o *Trichoderma reesei*.

Para la desmucilaginación de aceite de soja se prefiere particularmente una combinación de la fosfolipasa A<sub>1</sub> de *Thermomyces lanuginosus* o *Fusarium oxysporium* y/o de la fosfolipasa A<sub>2</sub> de páncreas de cerdo o páncreas de ganado bovino con una  $\alpha$ -amilasa de una especie de *Bacillus*. Para la desmucilaginación de aceite de colza se prefiere, en particular, una combinación de la fosfolipasa A<sub>1</sub> de *Thermomyces lanuginosus* o *Fusarium oxysporium* y/o de la fosfolipasa A<sub>2</sub> de páncreas de cerdo o páncreas de ganado bovino con una  $\alpha$ -amilasa de una especie de *Bacillus* o *Aspergillus*.

Por la expresión "aceite vegetal bruto" se entiende en este caso cualquier aceite bruto de origen vegetal. Aceites brutos preferidos son en el marco de la presente invención aceite de soja bruto, aceite de colza bruto, aceite de girasol bruto, aceite de oliva bruto, aceite de palma bruto, aceite de jatrofa bruto, aceites de algas bruto, aceite de camelina bruto, aceite de semillas de algodón bruto, en particular aceite de soja bruto, aceite de colza bruto, aceite de jatrofa bruto, aceite de camelina bruto y aceite de girasol bruto. El término "bruto" se refiere en este caso a que el aceite no ha sido sometido todavía a etapa de desmucilaginación, neutralización, blanqueo y/o desodorización alguna. En el marco del procedimiento de acuerdo con la invención es también posible emplear una mezcla de varios aceites brutos o tratar con las enzimas aceites pre-tratados, p. ej., pre-acondicionaos o previamente desmucilaginados.

La "puesta en contacto" puede tener lugar en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención de cualquier manera que sea conocida como adecuada por el experto en la materia para la finalidad de acuerdo con la invención. Tipos preferidos de puesta en contacto son en este caso una mezcladura del aceite bruto y de la composición de acuerdo con la invención.

Después de la puesta en contacto del aceite bruto con la composición de acuerdo con la invención, la mezcla a base de aceite bruto y composición se agita preferiblemente, de manera particularmente preferida con un agitador de paletas a 200 hasta 800 rpm, preferiblemente de 250 a 600 rpm y lo más preferiblemente a 300 a 500 rpm.

La temperatura de la mezcla se encuentra durante la puesta en contacto preferiblemente en el intervalo de 15 a 99 °C, más preferiblemente en el intervalo de 20 a 95 °C, más preferiblemente de 22 a 80 °C, asimismo preferiblemente de 25 a 65 °C, más preferiblemente de 27 a 55 °C y lo más preferiblemente de 30 a 45 °C. En este caso, la temperatura de la mezcla se ha de elegir siempre de modo que no se rebase la temperatura de desnaturalización de las enzimas, preferiblemente, la temperatura de la mezcla se encuentra al menos 5 °C por debajo de la temperatura de desnaturalización de las enzimas o bien de la temperatura de desnaturalización de las enzimas más baja. En donde, en el caso del empleo de enzimas que se aislaron de organismos termófilos, se han de preferir básicamente temperaturas más elevadas. Si en el marco de la presente invención se emplean una o varias enzimas termoestables, entonces la temperatura del proceso se encuentra preferiblemente en el intervalo de 80 a 120 °C, más preferiblemente en el intervalo de 85 a 100 °C. El uso de enzimas termoestables tiene la ventaja de que con ello se puede elegir una temperatura del procedimiento elevada, con lo cual se reduce la viscosidad del aceite vegetal y se puede acortar el procedimiento en su conjunto - también en virtud de una velocidad de reacción elevada de las enzimas. Además, en el caso de un tratamiento previo que ventajosamente se lleva a cabo asimismo a temperaturas

elevadas, se hace innecesario un enfriamiento subsiguiente por debajo de una temperatura de desnaturalización más baja de las enzimas empleadas. En conjunto, el uso de enzimas termoestables conduce con ello a un acortamiento del procedimiento y a una reducción de costos.

5 La duración de la puesta en contacto se encuentra en este caso preferiblemente en el intervalo de 1 minuto a 12 horas, más preferiblemente de 5 minutos a 10 horas, asimismo preferiblemente de 10 minutos a 6 horas, más preferiblemente de 20 minutos a 3 horas.

El valor del pH de la mezcla se encuentra durante a puesta en contacto preferiblemente en el intervalo de pH 3 a pH 7,5, más preferiblemente en el intervalo de pH 4 a pH 6 y de manera particularmente preferida en el intervalo de pH 4,0 a pH 5,2.

10 La puesta en contacto del aceite vegetal bruto con el primer y el segundo componente enzimático de la composición puede tener lugar en este caso al mismo tiempo o también de manera sucesiva. En la medida en que una puesta en contacto tenga lugar de manera sucesiva, se prefiere en el marco de la presente invención que el aceite vegetal bruto se ponga primeramente en contacto con el segundo componente enzimático. En el caso de que el aceite vegetal bruto se ponga primeramente en contacto con un componente enzimático y luego con el otro componente enzimático, se prefiere particularmente que después de la adición de un componente la mezcla se agite durante 30-300 minutos, preferiblemente 60 a 240 minutos, asimismo de manera preferida durante 70 a 120 minutos antes de que tenga lugar una adición del otro componente.

20 La "separación" de las sustancias mucilaginosas conforme a la etapa b) del procedimiento de acuerdo con la invención puede tener lugar de cualquier manera que es conocida como adecuada por el experto en la materia para la finalidad de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la separación tiene lugar, sin embargo, a través de centrifugación o filtración, siendo preferida la centrifugación. En el caso de la centrifugación tiene lugar una separación de fases de la mezcla, de modo que el aceite vegetal tratado, las sustancias mucilaginosas y la composición enzimática se presentan en fases separadas que puedan ser separadas fácilmente una de otra.

25 En una forma de realización preferida, en este caso la fase que contiene las sustancias mucilaginosas así como la fase que contiene la composición de acuerdo con la invención se separan del aceite tratado. Particularmente preferido es que en este caso se separe al mismo tiempo con las sustancias mucilaginosas el primer y/o segundo componente enzimático.

30 Las enzimas pueden ser regeneradas o bien purificadas después de la separación y pueden ser empleadas, por ejemplo, en un nuevo procedimiento de purificación. También en este caso es asimismo favorable trabajar de nuevo con las composiciones precedentemente descritas, empleando las otras enzimas disociadoras de glicósidos directamente en combinación con fosfolipasas o lipídaciltransferasas soportadas o emplear la composición con el fin de eliminar el mucílago de aceite vegetal que se adhiere, p. ej., a fosfolipasas soportadas, con el fin de poder reutilizar mejor en un nuevo procedimiento a las enzimas soportadas.

35 Otra forma de realización preferida de la presente invención se refiere, además, a un procedimiento tal como se describe precedentemente, que comprende, además, la etapa

c) puesta en contacto renovada del aceite vegetal conforme a la etapa b) con el primer y/o segundo componente enzimático.

40 La "puesta en contacto" tiene lugar en este caso preferiblemente bajo las mismas condiciones que las descritas precedentemente para la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención. En este caso, en una forma de realización particularmente preferida, el primer y/o segundo componente enzimático, se someten a una regeneración o purificación antes de la puesta en contacto renovada.

Antes de la puesta en contacto de acuerdo con la etapa a), el aceite vegetal bruto se pone en contacto con agua y/o ácido. Ácidos preferidos son en este caso ácidos complejantes con calcio y magnesio solos o en combinación tales como, p. ej., ácido cítrico y ácido fosfórico. En este caso se habla de un denominado "pre-acondicionamiento".

45 En una forma de realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la puesta en contacto con agua tiene lugar a una temperatura entre 30 °C y 90 °C durante 15 a 60 minutos, preferiblemente 30 a 60 minutos, prefiriéndose una temperatura de 35 a 85 °C y siendo particularmente preferida una temperatura de 40 a 80 °C. La puesta en contacto con ácido, en particular ácido cítrico o ácido fosfórico, tiene lugar en el marco del procedimiento de acuerdo con la invención preferiblemente a una temperatura entre 30 °C y 90 °C durante 5 a 60 minutos, preferiblemente durante 15 a 60 minutos, prefiriéndose una temperatura de 35 a 85 °C y siendo particularmente preferida una temperatura de 40 a 80 °C. En una forma de realización preferida, después del tratamiento con ácido tendrá lugar una etapa de neutralización con una base correspondiente, con el fin de alcanzar un valor del pH de 3,5 a 8,0, preferiblemente de 4 a 7. La composición se añade en este caso directamente al aceite vegetal sin llevar a cabo previamente una etapa de separación.

55 Antes de la adición de la o las fosfolipasas y/u otras enzimas se ha de procurar, sin embargo, que la temperatura de reacción no sobrepase el intervalo óptimo de temperaturas de la enzima, con el fin de impedir una desnaturalización

de la enzima. Son adecuadas temperaturas entre 35 y 65 °C, mejor entre 45 y 55 °C, en donde mediante el empleo de enzimas de organismos termófilos, es decir, enzimas particularmente estables frente a la temperatura, es posible un empleo a 80 hasta 100 °C, de modo que entre la puesta en contacto del aceite vegetal bruto con agua y/o ácido y la puesta en contacto con la composición no debe tener lugar disminución alguna de la temperatura. Un aumento de la estabilidad frente a la temperatura puede también alcanzarse mediante una inmovilización de las enzimas de los componentes enzimáticos. Dado que muchas enzimas presentan una determinada tolerancia frente a disolventes orgánicos (Faber, K., Biotransformations in Organic Chemistry (2001) Springer-Verlag, Heidelberg), en el marco de la presente invención pueden tratarse también con las enzimas aceites o mucílagos pre-tratados de manera correspondiente.

En formas de realización particularmente preferidas que no limitan de modo alguno el marco de la presente invención, el procedimiento de la presente invención comprende las etapas

Forma de realización A) preferida

a) puesta en contacto del aceite vegetal bruto, elegido de aceite de soja y/o aceite de colza, con una composición que comprende un primer componente enzimático con al menos una enzima elegida del grupo consistente en fosfolipasa A1, fosfolipasa A2 y fosfolipasa C y un segundo componente enzimático, del que se trata de  $\alpha$ -amilasa;

b) separación de las mucinas del aceite vegetal mediante centrifugación, llevándose a cabo antes de la etapa a) del procedimiento un denominado pre-acondicionamiento al mezclar el aceite bruto en una etapa del procedimiento adecuada con una cantidad de 1,5 a 3 ml/L de aceite en ácido orgánico, preferiblemente ácido cítrico. La temperatura de la mezcla se ajusta en este caso preferiblemente a 35 hasta 60 °C, de manera particularmente preferida a 48 °C. Después de un tiempo de reacción de 30 minutos a 2 horas, preferiblemente 1 hora, la mezcla se ajusta a un pH de 5 mediante la adición de una cantidad estequiométrica de lejía, preferiblemente lejía de sosa, en una cantidad de preferiblemente 0,5 a 2 mol/l, de manera particularmente preferida 1 mol/l. Sólo después se continúa procediendo conforme a la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención.

Forma de realización B) preferida

a) puesta en contacto del aceite vegetal bruto, elegido de aceite de soja y/o aceite de colza, con una composición que comprende un primer componente enzimático con al menos una enzima elegida del grupo consistente en fosfolipasa A1, fosfolipasa A2 y fosfolipasa C y un segundo componente enzimático, del que se trata de  $\alpha$ -amilasa; siendo particularmente preferido que la al menos una enzima del primer componente enzimático se presente inmovilizada sobre un soporte.

La puesta en contacto tiene lugar en este caso preferiblemente a una temperatura de 70 a 100 °C, más preferiblemente de 75 a 85 °C y utilizando exclusivamente enzimas termoestables o bien enzimas cuya temperatura de desnaturalización se encuentre al menos 1 °C, preferiblemente 5 °C por encima de la temperatura del proceso.

En este caso, antes de la etapa a) del procedimiento se lleva a cabo un pre-acondicionamiento, mezclando el aceite bruto en una etapa del procedimiento propia con una cantidad de 1,5 a 5 ml/L de aceite en ácido orgánico, preferiblemente 1,5 a 2 ml/L de aceite en ácido cítrico. La temperatura de la mezcla se ajusta en este caso preferiblemente a 35 hasta 60 °C, de manera particularmente preferida a 40 a 48 °C. Después de un tiempo de reacción de 30 minutos a 2 horas, preferiblemente 1 hora, la mezcla se acondiciona mediante la adición de una lejía, preferiblemente lejía de sosa, en una cantidad de preferiblemente 0,5 a 2 mol/l, de manera particularmente preferida 1 mol/l. Sólo después se continúa procediendo conforme a la etapa a) del procedimiento de acuerdo con la invención.

b) Separación por centrifugación de las mucinas del aceite vegetal.

Además, posibles ácidos fosfatídicos no todavía disueltos en el aceite vegetal y no disociados por las fosfolipasas se pueden continuar reduciendo al reducir el contenido en Ca y/o Mg del aceite tratado conforme al procedimiento de la presente invención. Por lo tanto, las formas de realización preferidas del procedimiento de acuerdo con la invención, arriba recogidas, se completan, en formas de realización particularmente preferidas, todavía mediante una etapa consecutiva en la que mediante la adición renovada de agentes de complejación tales como, p. ej., ácido cítrico o ácido fosfórico, se reduce adicionalmente el contenido en iones bivalentes y paralelamente a ello el contenido en P del aceite.

Con el procedimiento de acuerdo con la invención es posible reducir fuertemente el valor de fósforo en el aceite vegetal bruto. En este caso, el valor de fósforo se reduce a menos de 20 ppm, de manera particularmente preferida a menos de 10 ppm, de manera muy particularmente preferida a menos de 4 ppm de fósforo.

Además, con el procedimiento de acuerdo con la invención es posible reducir el contenido en calcio y magnesio del

aceite vegetal bruto a menos de 20 ppm, de manera particularmente preferida a menos de 15 ppm, de manera muy particularmente preferida a menos de 10 ppm, asimismo de manera preferida a menos de 8 ppm y lo más preferiblemente a menos de 4 ppm. En una forma de realización muy particularmente preferida el contenido en calcio y magnesio se reduce a menos de 3 ppm.

## 5 Métodos

Se utilizaron los siguientes métodos de análisis:

Determinación del contenido de fósforo en los aceites vegetales

La determinación de fósforo tuvo lugar mediante ICP conforme a DEV E-22.

Determinación del contenido de calcio y magnesio en los aceites vegetales

10 La determinación de fósforo tuvo lugar mediante ICP conforme a DEV E-22.

Determinación del contenido de ácidos grasos libres (FFA)

El contenido de ácidos grasos libres se determina a través del consumo de hidróxido sódico o hidróxido de potasio a través de una reacción de saponificación. Se obtiene el contenido porcentual de ácidos grasos libres en el aceite investigado. La determinación tuvo lugar conforme a la norma DIN 53402 (método DGF C-V 2).

15 Determinación del volumen de mucílago

Con ayuda de esta determinación se mide la fase mucilaginosa contenida en el aceite de mucílago no tratado enzimáticamente y tratado enzimáticamente. Un tubo de centrifuga de 10 mL se calienta a la temperatura de trabajo de la tanda de reacción, se introducen las muestras (2 x 2 mL) y se centrifugan a temperatura ambiente durante al menos 4 minutos a 3000 rpm con el fin de separar del aceite la fase mucilaginosa. De las fases oleosas superiores se toman muestras para la analítica. Para fines de documentación, se fotografía adicionalmente el resultado de la formación de fases.

20 Determinación del contenido de aceite en la fase mucilaginosa

La determinación del contenido de aceite residual en la fase mucilaginosa tiene lugar según la extracción de Soxhett conforme a la norma DIN ISO 659.

25 Variante 1:

La cantidad de aceite bruto a tratar, 400 a 500 g, se incorpora en un reactor Duran DN120 de 1000 mL y se toman muestras para la analítica. El aceite en el reactor Duran se calienta con ayuda de una capa calefactora hasta una temperatura de 35 a 60 °C, en particular 48 °C, debiéndose mantener una temperatura a la que la enzima no se desnaturalice. Una vez alcanzada la temperatura, se comienza con el pre-acondicionamiento. Para ello, se añade dosificadamente al aceite una cantidad definida de ácido cítrico diluido (p. ej., 450 ppm, 1,372 mL) dependiente de la cantidad de aceite. A continuación, la mezcla se combina a fondo con un Ultraturax durante 1 minuto. Como alternativa, se incuba durante 1 hora bajo agitación a aproximadamente 600 rpm con el fin de esperar la reacción del ácido. A continuación, se añade una cantidad definida de lejía de sosa (1 mol/L, cantidad restante hasta 2% v/v o bien 3% v/v, restando el agua de la adición del ácido y la adición de enzima) y se incuba durante otros 10 minutos bajo agitación. En este punto tiene lugar la adición de la enzima, de la mezcla de enzimas o del producto inmovilizado, preferiblemente disuelto en tampón. La enzima se mezcla para lo cual el número de revoluciones del agitador puede ser aumentado brevemente (1 minuto hasta 900 rpm), a continuación se continúa agitando a un número bajo de revoluciones.

40 La toma de muestras tiene lugar a intervalos de tiempo definidos. La muestra se recoge con ayuda de una pipeta, se introduce en un tubo de centrifuga a temperatura ambiente (temperatura de la tanda de reacción) y a temperatura ambiente se centrifuga durante al menos 4 minutos a 3000 rpm con el fin de separar del aceite la fase mucilaginosa. Para fines de documentación se fotografía el resultado de la formación de fases, del sobrenadante se toman muestras para la determinación del contenido de fósforo, calcio y magnesio.

Variante 2:

45 En otra realización, se añaden al aceite bruto fosfolipasas y enzimas adicionales en una combinación adecuada en forma de enzimas libres o enzimas inmovilizadas, junto con una fase acuosa (tampón enzimático, pH 5) al 0,05 hasta 5% p/v. Se mezcla a fondo la emulsión consistente en agua, enzima y eventualmente soportes de enzima y aceite. De manera ideal, la reacción se lleva a cabo de forma a temperatura entre 20 y 70 °C, mejor entre 40 y 65 °C. A continuación, se espera la separación de fases, los sólidos se depositan o se pueden separar según un procedimiento estándar conocido por el experto en la materia, p. ej., a través de centrifugación o filtración. Como tratamiento posterior, el aceite se puede desproveer del resto de mucílago con ácido diluido (p. ej., ácido cítrico) o lejía según un procedimiento conocido como "Degumming" (desmucilagización) por el experto en la materia.

50

## Variante 3:

En otra realización, la fase mucilaginosa se trata con enzimas. A la fase mucilaginosa, la cual se obtiene según un procedimiento conocido por el experto en la materia como “degumming” se añaden junto a fosfolipasas, otras enzimas. Éstas se pueden encontrar disueltas en una fase acuosa, o suspendidas en un disolvente orgánico. La tanda se atempera de manera ideal hasta una temperatura entre 20 y 70 °C mejor hasta una temperatura entre 35 y 60 °C. La tanda se mezcla a fondo hasta que haya concluido el proceso. Esto puede verificarse mediante mediciones de la viscosidad o visualmente mediante disolución de la fase mucilaginosa, por lo demás sólida. Mediante centrifugación se puede alcanzar una separación de fases, las distintas fases pueden ser separadas. Por norma general, la fase superior se compone del aceite obtenido, la fase media de los fosfolípidos y la fase inferior es una fase acuosa y contiene las enzimas. Mediante la reutilización de la fase acuosa, las enzimas se pueden reciclar y reutilizar. En función del contenido de iones bivalentes, el aceite o la fase acuosa que contiene la enzima pueden ser purificados de los iones mediante la adición de agentes complejantes antes del uso ulterior.

## Variante 4:

En otra realización, el aceite bruto se lleva a una temperatura elevada, preferentemente 70 a 100 °C, más exactamente 75 a 85 °C. El aceite bruto se acondiciona con ácido y lejía según el procedimiento arriba descrito, la temperatura se mantiene y se añaden enzimas termoestables. Por lo demás, se procede como ya se ha descrito. La enzima se mezcla para lo cual se puede aumentar brevemente el número de revoluciones del agitador (p. ej., 1 minuto a 900 rpm), a continuación se continúa agitando a 600 rpm hasta que finalice la reacción. La separación de la fase mucilaginosa puede tener lugar tal como se ha descrito precedentemente.

## Ejemplos y Figuras:

La invención se explica con mayor detalle en lo que sigue con ayuda de Figuras y Ejemplos. Se hace en este caso hincapié en que los Ejemplos y las Figuras poseen únicamente un carácter ilustrativo e ilustran formas de realización particularmente preferidas de la presente invención. Ni los Ejemplos ni las Figuras limitan el marco de la presente invención.

## Muestran:

Fig. 1 aceite de soja: pre-acondicionamiento con 2% de porción total de agua

Fig. 2 aceite de soja: pre-acondicionamiento con adición de enzima PLA 1 0,3 unidades/g de aceite y 2% de porción total de agua

Fig. 3 aceite de soja: pre-acondicionamiento con adición de enzima PLA 1 0,3 unidades/g de aceite y la enzima  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus spec* 1 unidad de aceite, 2% de porción total de agua

Fig. 4 aceite de soja: pre-acondicionamiento con adición de enzima PLA 1 0,3 unidades/g de aceite y la enzima mananasa 0,3 unidades/g de aceite, 2% de porción total de agua (no conforme a la invención)

Fig. 5 aceite de colza: pre-acondicionamiento con 3% de porción total de agua

Fig. 6 aceite de colza: pre-acondicionamiento con adición de enzima PLA 1 0,3 unidades/g de aceite y 3% de porción total de agua

Fig. 7 aceite de colza: pre-acondicionamiento con adición de enzima PLA 1 0,3 unidades/g de aceite y la enzima amilasa PET 1 unidad de aceite, 3% de porción total de agua

Fig. 8 aceite de colza: pre-acondicionamiento con adición de enzima PLA 1 0,3 unidades/g de aceite y la enzima  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus*, 1 unidad/g de aceite, 3% de porción total de agua

## Ejemplo 1:

Conforme a la variante de reacción 1 se utilizó un aceite de soja con los siguientes contenidos de partida: fósforo 700 ppm, calcio 65,6 ppm, magnesio 62,6 ppm y un contenido de ácidos grasos libres de 1%. El aceite bruto se sometió a un pre-acondicionamiento con ayuda de ácido cítrico acuoso (450 ppm) y lejía de sosa acuosa (1 mol/L). Se tomaron regularmente muestras (véase la Tabla 1). Como comparación este pre-acondicionamiento se llevó a cabo precisamente con la adición de una enzima, fosfolipasa A1 del organismo *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich) (véase la Figura 2, Tabla 2). En la Figura 3, Tabla 3, se representan resultados del pre-acondicionamiento con la adición de la enzima PLA 1 y de otra enzima, una  $\alpha$ -amilasa del organismo *Bacillus spec.* (Sigma-Aldrich). En la Figura 4, Tabla 4, de nuevo el mismo proceso bajo la adición de la enzima PLA 1 y de otra enzima, una mananasa (ASA-Spezialenzyme). La Figura 4 y la Tabla 4 muestran un ejemplo no de acuerdo con la invención.

50

Tab. 1 Pre-acondicionamiento con 2% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	7,8	8,8	9,3	9,7	9,8
Mg [ppm]	4,1	3,2	3,1	3,3	3,2
P [ppm]	33	20	18	20	21
FFA [%]	0,75			0,76	0,78
Fase mucilaginosa [%]	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0

Tab. 2 Pre-acondicionamiento con adición de PLA1 de *Thermomyces lanuginosus* 0,3 unidades/g de aceite y 2% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	9,6	9,9	9,3	8,1	7
Mg [ppm]	4,4	3,2	3,6	3	2,2
P [ppm]	23	14	18	15	10
FFA [%]	0,79			1,24	1,32
Fase mucilaginosa [%]	4,5	4,5	4,5	4,0	4,0

5

Tab. 3 Pre-acondicionamiento con adición de PLA1 0,3 unidades/g de aceite y  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus spec.* 1 unidad/g de aceite, 2% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	4,1	7,1	5,6	4,8	4,1
Mg [ppm]	1,9	2,2	1,8	1,6	1,4
P [ppm]	13	11	9,4	8,9	6,2
FFA [%]	0,86			1,19	1,16
Fase mucilaginosa [%]	4,0	2,5	2,5		2,5

10 Tab. 4 Pre-acondicionamiento con adición de PLA1 0,3 unidades/g de aceite y mananasa 0,3 unidades/g de aceite, 2% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA (no conforme a la invención)

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	5,6	6	5,4	4,6	4,3
Mg [ppm]	3,5	2,3	2,1	1,8	1,7
P [ppm]	27	14	13	12	11
FFA [%]	0,75			1,19	1,24
Fase mucilaginosa [%]	4,5	2,8	2,6	2,5	2,5

Como se puede observar de la Figura 1, la aplicación de ácido y lejía sobre el aceite bruto como pre-acondicionamiento conduce a un volumen nada desconsiderable de la fase mucilaginosa el cual posteriormente, a pesar del empleo de un agitador a 600 rpm, no disminuye esencialmente. La única foto corresponde en este caso a

una toma de muestra, las tomas de muestra tienen lugar en los instantes 10, 60, 120, 180 y 240 minutos (en cada caso de izquierda a derecha). En la Tabla 1 se recogen los correspondientes datos analíticos, el contenido en fósforo descendió después de 240 minutos de 33 ppm a 21 ppm, la concentración de los iones bivalentes calcio y magnesio aumenta ligeramente en el caso del calcio de 7,8 ppm a 9,8 ppm, la concentración del magnesio disminuye de 4,1 ppm a 3,2 ppm en el transcurso de la reacción. El contenido de ácidos grasos libres permanece casi invariable. El pre-acondicionamiento sirve como reacción de preparación para la desmucilaginosación del aceite y, al mismo tiempo, como tratamiento de referencia.

En la Figura 2, en el caso de utilizar la enzima fosfolipasa A1 de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich), se puede reconocer una disminución de la fase mucilaginososa en el transcurso de la reacción (en función de la medición / toma de muestras una foto). Los datos correspondientes y los instantes de la toma de muestras se representan en la Tabla 2. En la Tab. 2 resulta una disminución de la concentración de calcio de 9,6 ppm a 7 ppm, una disminución de la concentración de magnesio de 4,4 ppm a 2,2 ppm y una disminución del contenido de fósforo de 23 ppm a 10 ppm, el contenido de ácidos grasos libres aumenta de 0,79% a 1,32%. A partir del aumento en el contenido de los ácidos grasos libres y de la disminución del contenido de fósforo se puede concluir que la PLA 1 es enzimáticamente activa y, por consiguiente, la desmucilaginosación de aceite funciona con éxito. El aumento del ácido graso libre es un símbolo de la actividad de la PLA 1 que disocia los ácidos grasos de las moléculas de fosfolípidos y también la fase mucilaginososa disminuye de forma continua. Con el fin de abrir para el aceite una más amplia paleta de aplicación, el objetivo es continuar disminuyendo el contenido en fósforo.

En la Figura 3 se representa el volumen de la fase mucilaginososa de un aceite bruto pre-acondicionado, tratado con PLA 1 y adicionalmente con alfa-amilasa de *Bacillus spec.* (Sigma-Aldrich). A partir de los correspondientes datos analíticos de la Tabla 3 se puede observar que, sorprendentemente, ya después de 60 minutos se alcanza una fase mucilaginososa reducida de 2,5%. Adicionalmente, el contenido de ácidos grasos libre aumenta de 0,86% a 1,16% y, con ello, apunta a la actividad de la fosfolipasa. El contenido en fósforo se ha reducido de 700 ppm en el aceite bruto a 13 ppm y finalmente, después de 240 minutos, a 6,2 ppm. La concentración del calcio oscila ligeramente, el magnesio disminuye ligeramente.

En la Figura 4 y la Tabla 4 (no conforme a invención) se representan datos experimentales en el caso de utilizar otra combinación enzimática. Se utilizó de nuevo la fosfolipasa A1 y una mananasa (ASA-Spezialenzyme). A partir de los datos se puede observar que ya después de 60 minutos ha tenido lugar una fuerte reducción de la fase mucilaginososa. El contenido de ácidos grasos libre aumenta de 0,75 % a 1,24 %, el contenido en fósforo disminuye de 700 ppm en el aceite bruto, a través de 27 ppm (muestra de 10 minutos), a 11 ppm después del tratamiento durante 240 minutos con ambas enzimas. También las concentraciones de iones bivalentes disminuyen a lo largo de todo el transcurso de la reacción. Los resultados confirman que, sorprendentemente, mediante medición de una enzima disociadora de glicósidos adicional se produce una reducción más rápida e intensa de la fase mucilaginososa.

Ejemplo 2:

Conforme a la variante de reacción 1, se utilizó un aceite colza con los siguientes contenidos de partida: fósforo 1150 ppm, calcio 370 ppm, magnesio 146 ppm y un contenido en ácidos grasos libres de 1,95 %. El aceite bruto se sometió a un pre-acondicionamiento con ayuda de ácido cítrico acuoso (1000 ppm) y lejía de sosa acuosa (4 mol/L). Se tomaron regularmente muestras (véase la Tabla 5). Como comparación, este pre-acondicionamiento se realizó precisamente con la adición de una enzima, fosfolipasa A1 del organismo *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich) (véase la Figura 6, Tabla 6). En la Figura 7, Tabla 7, se representan los resultados del pre-acondicionamiento con la adición de la enzima PLA 1 y de otra enzima, una amilasa PET del organismo *Bacillus subtilis* (ASA Spezialenzyme GmbH). En la Figura 8, Tabla 8, de nuevo el mismo proceso bajo la adición de la enzima PLA 1 y de otra enzima, una  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich).

Tab. 5 Pre-acondicionamiento con 3% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	76	11	9,5	9,4	9,5
Mg [ppm]	31	2,8	1,7	1,6	1,7
P [ppm]	247	20	14	13	14
FFA [%]	1,73			1,68	1,72
Fase mucilaginososa [%]	5,8	6,5	6,0	6,0	5,8

Tab. 6 Pre-acondicionamiento con adición de PLA1 de *Thermomyces lanuginosus* 0,3 unidades/g de aceite y 3% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	26	9,7	8,7	7,9	7,9
Mg [ppm]	9,7	2,1	1,8	1,4	1,5
P [ppm]	82	17	15	12	12
FFA [%]	1,76			2,35	2,14
Fase mucilaginosa [%]	6,5	5,6	5,0	4,5	5,5

5 Tab. 7 Pre-acondicionamiento con adición de PLA1 0,3 unidades/g de aceite y amilasa PET 1 unidad/g de aceite, 0,3% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	16	14	13	12	11
Mg [ppm]	4,8	2,8	2,7	2,4	1,9
P [ppm]	38	21	19	15	13
FFA [%]	1,84			2,24	2,20
Fase mucilaginosa [%]	6,9	5,3	4,0	3,8	3,4

Tab. 8 Pre-acondicionamiento con adición de PLA1 0,3 unidades/g de aceite y una  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus* unidad/g de aceite, 3% de porción total de agua, contenido en fósforo, calcio, magnesio y FFA

Tiempo [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	39	12	9,3	8,1	7,1
Mg [ppm]	15	3,2	2,2	1,7	1,3
P [ppm]	130	25	19	14	10
FFA [%]	1,92			2,49	2,45
Fase mucilaginosa [%]	6,5	5,1	4,6	4,4	3,6

10 Como se puede observar de la Figura 5, la aplicación de ácido y lejía sobre el aceite bruto como pre-acondicionamiento conduce a un volumen considerable de la fase mucilaginosa, el cual posteriormente, a pesar del empleo de un agitador a 600 rpm, no disminuye esencialmente. La única foto corresponde en este caso a una toma de muestra, las tomas de muestras tienen lugar en los instantes 10, 60, 120, 180 y 240 minutos (de izquierda a derecha). En la Tabla 5 se recogen los correspondientes datos analíticos, el contenido en fósforo descendió después

15 de 240 minutos de 247 ppm a 14 ppm, la concentración de los iones bivalentes calcio y magnesio disminuye en el caso del calcio de 76 ppm a 9,5 ppm, la concentración del magnesio disminuye de 31 ppm a 1,7 ppm en el transcurso de la reacción. El contenido de ácidos grasos libres permanece casi invariable. El pre-acondicionamiento sirve como reacción de preparación para la desmucilaginación del aceite y, al mismo tiempo, como tratamiento de referencia.

20 En la Figura 6, en el caso de utilizar la enzima fosfolipasa A1 de *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich), se puede reconocer una ligera disminución de la fase mucilaginosa en el transcurso de la reacción (en función de la medición / toma de muestras una foto) a aprox. 5% al final de la reacción.

Los datos correspondientes y los instantes de la toma de muestras están representados en la Tabla 6. El contenido de ácidos grasos libres aumenta de 1,76 % a 2,14 %. El aumento del ácido graso libre es un síntoma de la actividad de la PLA 1 que disocia los ácidos grasos a partir de las moléculas de fosfolípidos.

25

5 Sorprendentemente, se encontró entonces que mediante la adición de una enzima disociadora de glicósidos a la fosfolipasa se reduce claramente la fase mucilaginoso del tratamiento de aceite de colza, véanse las Figuras 7 y 8 y los correspondientes datos de las Tablas 7 y 8. En la Figura 7 se añadió una amilasa PET (ASA Spezialenzyme), en la Figura 8 una  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich). Los resultados confirman también aquí que, sorprendentemente, mediante la adición de otra enzima disociadora de glicósidos se produce una reducción más rápida e intensa de la fase mucilaginoso que significa un aumento del rendimiento en aceite.

Tabla 9: Aceite de colza: Rendimiento total de las reacciones del Ejemplo 2 según la extracción de Soxhlet de la fase mucilaginoso

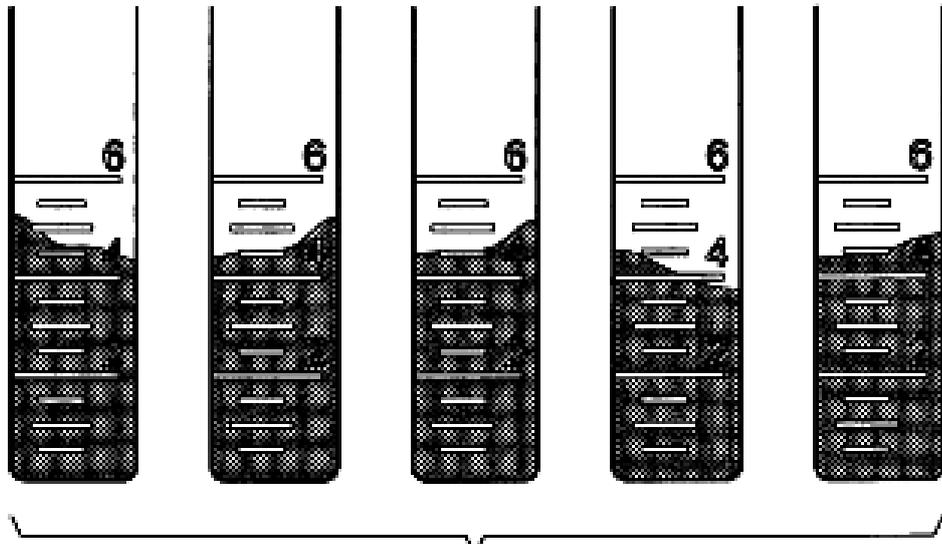
	Rendimiento en aceite [%]
H3Cit (ácido cítrico)	96
PLA1	97
PLA1 + amilasa PET	98,5
PLA1 + $\alpha$ -amilasa de <i>Aspergillus</i>	98

10 En la Tabla 9 se representa el rendimiento total de aceite (aceite de colza) de las reacciones del Ejemplo 2 según la extracción de Soxhlet de la fase mucilaginoso. En este caso, se puede observar que una enzima adicional disociadora de glicósidos en combinación con la PLA 1 aumenta considerablemente el rendimiento de aceite de 96% de rendimiento en el caso de tratamiento sin enzima (H3Cit) o bien 97% de rendimiento en el caso de tratamiento con la enzima PLA 1 sola, a en cada caso 98% (PLA 1 +  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus*) o bien a 98,5% (PLA 1 + amilasa de PET).

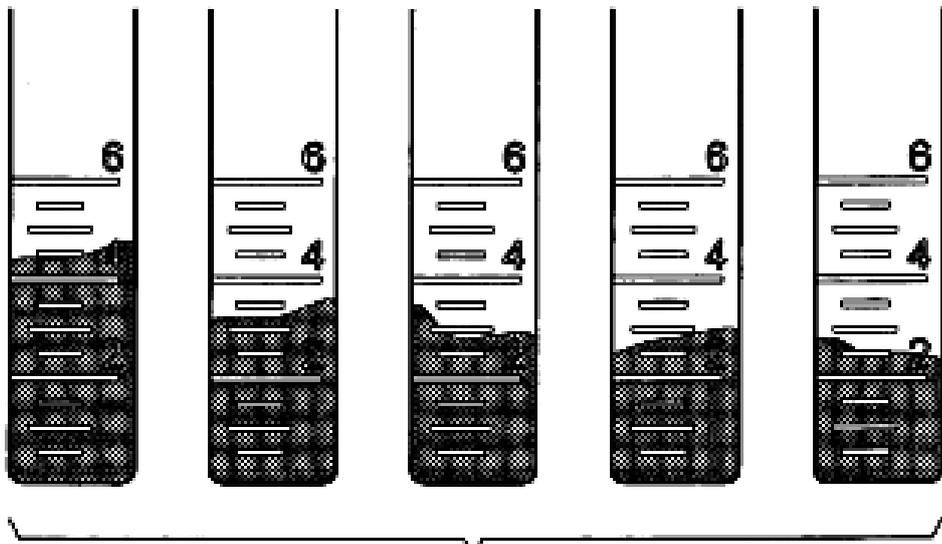
15 Cada año se producen en todo el mundo aprox. 22,1 millones de toneladas de aceite de colza (USDA FAS – 2010). En el caso de un aumento del rendimiento de aceite de 2-2,5% mediante el proceso enzimático representado en esta memoria se podrían producir aprox. 440.000.-550.000 toneladas más de aceite de colza al año.

**REIVINDICACIONES**

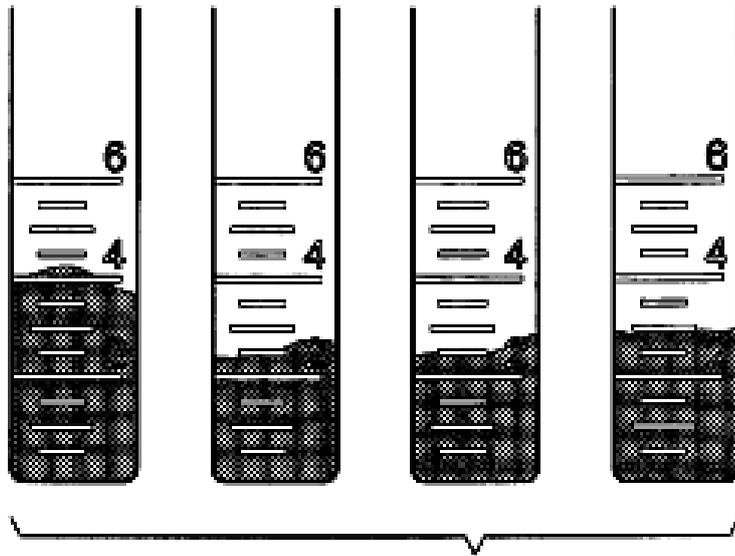
1. Procedimiento para reducir la emulsionabilidad de aceite vegetal en fases acuosas, que comprende las etapas:
  - 5 a) puesta en contacto del aceite vegetal bruto con una composición que comprende un primer componente enzimático que comprende al menos una enzima disociadora de fosfolípidos, así como un segundo componente enzimático que comprende al menos una enzima no disociadora de fosfolípidos, tratándose del segundo componente enzimático de una  $\alpha$ -amilasa;
  - 10 b) separación de las mucinas del aceite vegetal, en el que antes de la puesta en contacto conforme a la etapa a), el aceite vegetal bruto se pone en contacto con agua y/o ácido, pero antes de la etapa a) no tiene lugar separación alguna de la fase acuosa, sino que el aceite bruto pre-acondicionado se emplea directamente en la etapa a).
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el primer componente enzimático se elige del grupo consistente en fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa C, fosfolipasa B, fosfolipasa D y aciltransferasa.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que la fosfolipasa A, procede de *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Pseudomonas*, páncreas de cerdo o páncreas de ganado bovino; y/o independientemente, la fosfolipasa A<sub>2</sub> procede de páncreas de cerdo, páncreas de ganado bovino, *Streptomyces violaceoruber*, *Naja mossambica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* o especies de *Pseudomonas*; y/o independientemente, fosfolipasa C procede de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus* o especies de *Pseudomonas*; y/o independientemente, la fosfolipasa B procede de *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, especies de *Pseudomonas*, páncreas de cerdo o páncreas de ganado bovino.
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, en el que la fosfolipasa A<sub>1</sub> procede de *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium* y/o independientemente, fosfolipasa A<sub>2</sub> procede de páncreas de cerdo, páncreas de ganado bovino, *Streptomyces violaceoruber* o *Naja mossambica*, y/o independientemente, fosfolipasa C procede de *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* o *Listeria monocytogenes*.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1-3, en el que la alfa amilasa disocia enlaces alfa(1-4)glicosídicos, alfa(1-2)glicosídicos, alfa(1-6)glicosídicos), beta(1-3)glicosídicos, beta(1-4)glicosídicos y/o beta(1-6)glicosídicos.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Bacillus sp.*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que la relación de la actividad enzimática del primer componente enzimático a la actividad enzimática del segundo componente enzimático se encuentra en el intervalo de 0,01 : 6 unidades/g de aceite a 6 : 0,01 unidades/g de aceite.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el primer y/o el segundo componente enzimático se presenta/presentan en forma soportada.
9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que al mismo tiempo con las mucinas también se separa del aceite vegetal el primer y/o el segundo componente enzimático.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que en lugar del aceite vegetal se emplea mucílago de aceite vegetal.



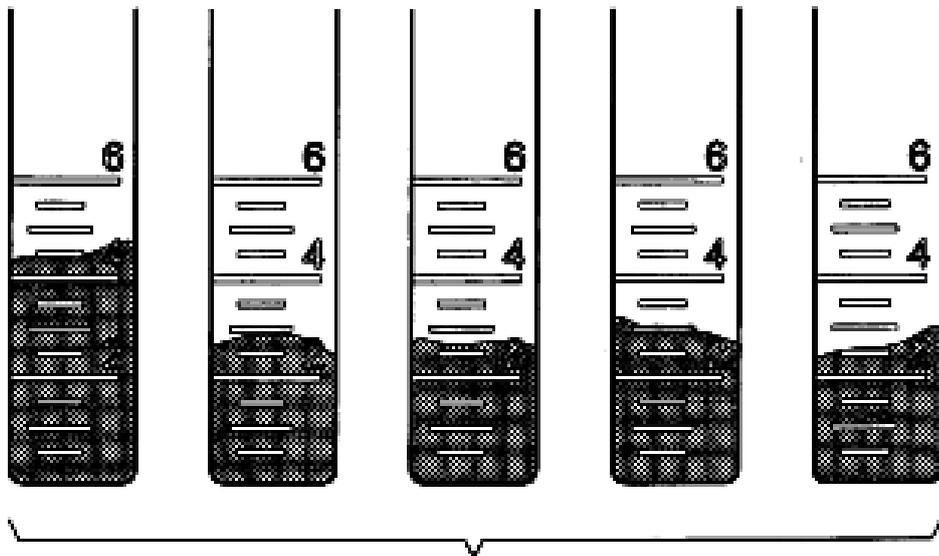
**Fig. 1**



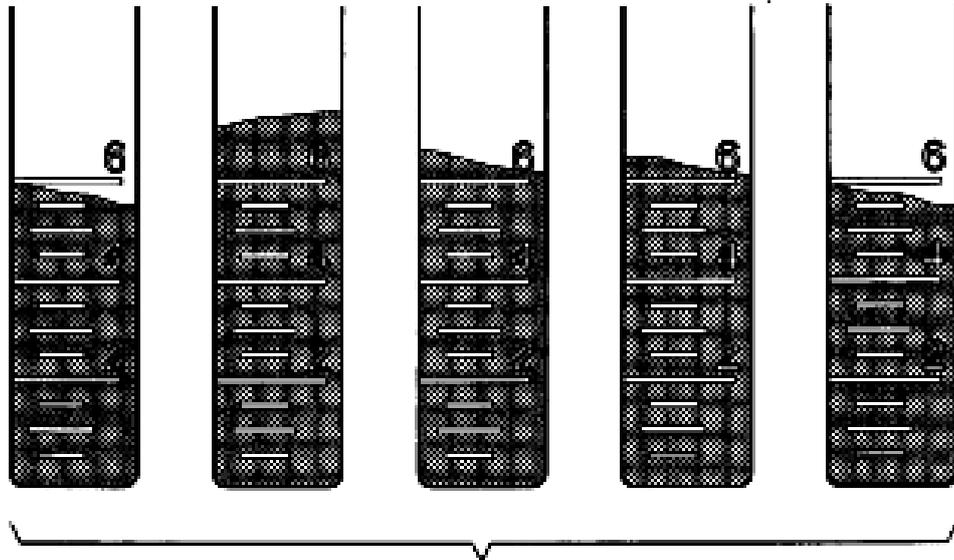
**Fig. 2**



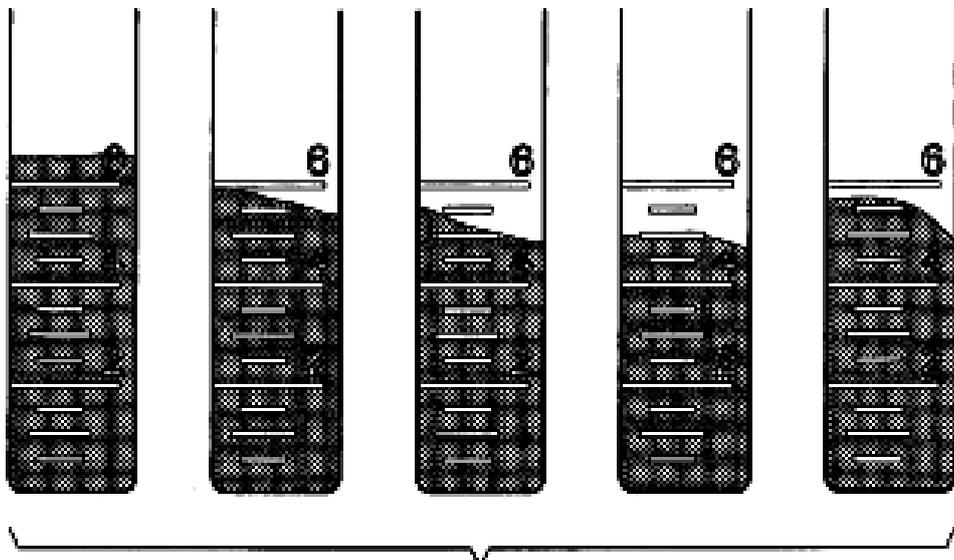
**Fig. 3**



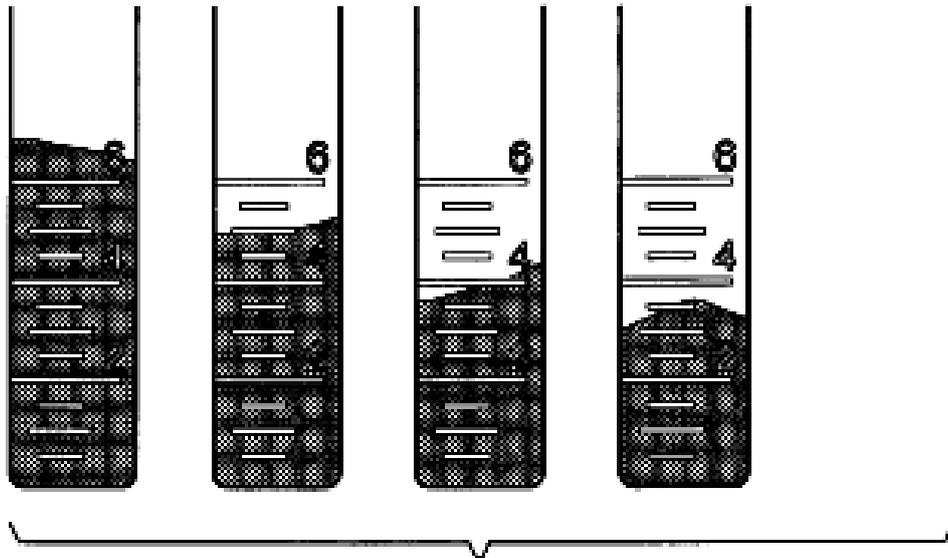
**Fig. 4**



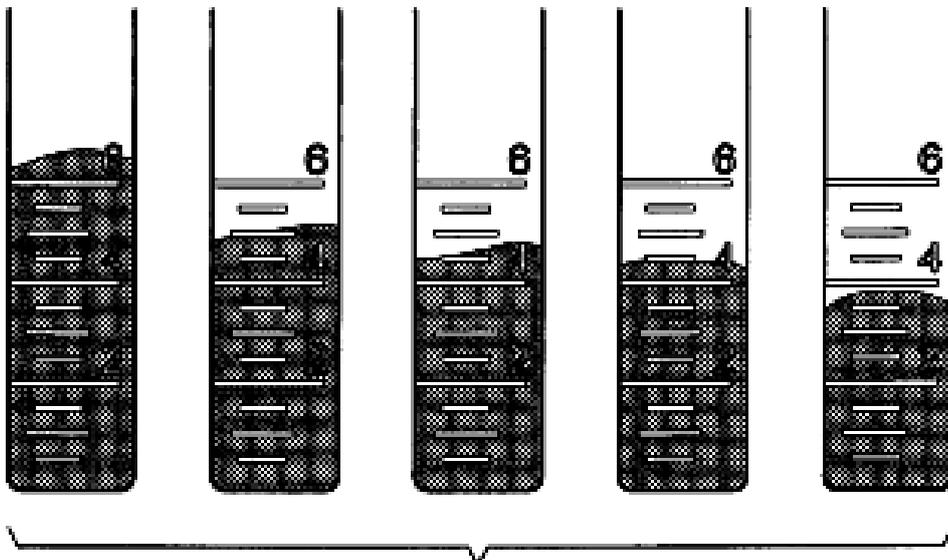
**Fig. 5**



**Fig. 6**



**Fig. 7**



**Fig. 8**