

(19)



(11)

EP 2 799 531 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
05.11.2014 Patentblatt 2014/45

(51) Int Cl.:
C11B 3/00 (2006.01) **C11B 3/04** (2006.01)
C11B 3/16 (2006.01)

(21) Anmeldenummer: **13166529.1**

(22) Anmeldetag: **03.05.2013**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR**
Benannte Erstreckungsstaaten:
BA ME

(71) Anmelder: **Clariant Produkte (Deutschland) GmbH
65929 Frankfurt am Main (DE)**

(72) Erfinder:
• **Suck, Kirstin, Dr.
80939 München (DE)**
• **Sohling, Ulrich, Dr.
85356 Freising (DE)**
• **Bubenheim, Paul
22359 Hamburg (DE)**

(54) **Einsatz von Phosphatasen zur enzymatischen Entschleimung von Triglyceriden**

(57) Die Erfindung stellt ein Verfahren zur enzymatischen Entschleimung von Triglyceriden und zur Entölung des Pflanzenölschleims, der bei der Ölent-

mung anfällt, bereit und umfasst das In-Kontakt-Bringen des Triglycerids mit mindestens einer Phosphatase sowie die Trennung der Schleimphase von der Ölphase.

EP 2 799 531 A1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Erhöhung der Ölausbeute bei der Entschleimung von Triglyceriden durch Verwendung einer Phosphatase. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung mindestens einer Phosphatase zur Entschleimung von rohen Pflanzenölen. Ein weiterer Gesichtspunkt der Erfindung betrifft die Entölung von Pflanzenölschleim, wobei neben der Erhöhung der Ölausbeute die Gewinnung und Reinigung des Lecithins im Vordergrund steht.

[0002] Rohe Pflanzenöle enthalten Phosphatide, eiweiß- und kohlenhydrathaltige Stoffe, pflanzliche Schleimstoffe sowie kolloidale Verbindungen, die die Haltbarkeit des Öls stark herabsetzen. Diese Stoffe müssen daher entfernt werden.

[0003] Bei der Raffination von Pflanzenölen werden die unerwünschten Begleitstoffe entfernt. Man unterscheidet zwischen chemischer und physikalischer Raffination. Die chemische Raffination besteht aus den Prozessen 1. Entschleimung, 2. Neutralisation, 3. Bleichung, 4. Desodorierung. Bei der Entschleimung werden Phospholipide ("Schleimstoffe") und Metallionen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) aus dem Öl entfernt. Die Neutralisation dient zur Extraktion der Fettsäuren. Bei der Bleichung werden die Farbstoffe, weitere Metallionen und restliche Schleimstoffe entfernt. Bei der Desodorierung handelt es sich um eine Wasserdampfdestillation, bei der weitere Verbindungen entfernt werden, die den Geruch und den Geschmack des Öls beeinträchtigen. Bei der physikalischen Raffination wird die Entsäuerung zusammen mit der Desodorierung am Ende des Raffinationsprozesses durchgeführt.

[0004] Die Entschleimung der Öle kann durch Extraktion der Phospholipide mit Wasser oder einer wässrigen Lösung einer Säure erfolgen, die Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen komplexiert, wie z. B. Zitronensäure oder Phosphorsäure. Häufig führt man hierbei zunächst eine wässrige, sogenannte Vorentschleimung durch, mit der die wasserlöslichen Phospholipide entfernt werden. Man spricht hierbei von hydratisierbaren Phospholipiden.

Definitionen

[0005] Unter dem Begriff **Triglyceride** werden dreifache Ester des Glycerins mit Fettsäuren verstanden, welche den Hauptbestandteil von natürlichen Fetten und Ölen darstellen, sei es pflanzlichen oder tierischen Ursprungs. Triglyceride umfassen pflanzliche oder tierische Fette und Öle, und deren Mischungen sowohl untereinander als auch mit synthetischen bzw. modifizierten Fetten und Ölen.

[0006] Unter dem Begriff **Pflanzenöl** wird hierbei jedes Öl pflanzlichen Ursprungs verstanden. Bevorzugte Öle sind im Sinne der vorliegenden Erfindung Sojaöl, Rapsöl, Canolaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Palmöl, Jatrophaöl, Leindotteröl, oder Baumwollsaatöl. Überdies umfasst das Pflanzenöl im Sinne der Erfindung Mischungen verschiedener Pflanzenöle untereinander, als auch die Mischung von Pflanzenöl mit tierischen und/oder synthetischen bzw. modifizierten Fetten und Ölen.

[0007] Die Bezeichnung "**roh**" bezieht sich dabei darauf, dass das Öl noch keinem Entschleimungs-, Neutralisations-, Bleichungs- und/oder Desodorierungsschritt unterzogen wurde. Es ist im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens auch möglich, dass eine Mischung mehrerer Rohöle eingesetzt wird oder vorbehandelte, z.B. vorentschleimte und/oder vorkonditionierte Öle mit den Enzymen behandelt werden.

[0008] Unter **Schleimphase** / Schleimstoffe / Pflanzenölschleim versteht man hier im folgenden Text die gesamte Gruppe dieser Stoffe, die nach Behandlung mit einer säurehaltigen und/oder wässrigen Lösung aus dem Öl als schwere Phase ausfallen (Michael Bokisch: Fats and Oils Handbook, AOCS Press, Champaign, Illinois, 1998, Seite 428-444). Die Verwendung dieses Pflanzenölschleims als Ausgangsmaterial ist insbesondere für die Gewinnung von Lecithin von Bedeutung, da Lecithin ein wesentlicher Bestandteil des Pflanzenölschleims ist.

[0009] Unter dem Begriff "**Verringerung des Ölgehalts im Pflanzenölschleim**" versteht man die Abtrennung des Öls aus dem eingesetzten Pflanzenölschleim, welcher dadurch entölt wird. Je nach Betrachtungsweise stehen die Gewinnung von Öl und/oder die Gewinnung der Lecithin-haltigen Schleimphase im Vordergrund.

[0010] Unter dem Begriff "**Vorentschleimung**" bzw. "Naßentschleimung" wird eine Behandlung des Rohöls mit Wasser oder einer wässrigen Säurelösung verstanden, um wasserlösliche Phospholipide weitestgehend aus dem Öl zu entfernen. Auch kann im Rahmen einer Vor- bzw. Naßentschleimung nach der Säurezugabe ggf. eine Zugabe von Alkali erfolgen, um die Säure zu neutralisieren. Vor der Enzymzugabe erfolgt die Abtrennung der wässrigen Phase. Nach einer Vorentschleimung wird der Phosphorgehalt im Rohöl von ca. 500-1500 ppm, z.B. für Soja und Raps, auf unter 200 ppm im vorentschleimten Öl gesenkt. Durch die Vorentschleimung kann z.B. Lecithin aus der entstandenen Schleimphase gewonnen werden bzw. die Schleimphase als Futtermittel aufgearbeitet werden. Der Nachteil der Abtrennung der wässrigen Phase bzw. der Senkung des Phosphorgehaltes ist jedoch ein Ausbeuteverlust bezüglich des Öls. Die in die wässrige Phase übergehenden Phosphatide wirken emulgierend und führen dazu, dass ein Teil des Öls in der wässrigen Phase emulgiert und mit dieser abgetrennt wird. Anschließend kann das Öl enzymatisch weiterbehandelt werden, wobei die Enzyme ggf. in einem weiteren Schritt abgetrennt werden müssen.

[0011] Unter dem Begriff "**Vorkonditionierung**" des Öls wird in dieser Erfindung die Zugabe von Wasser bzw. einer wässrigen Säurelösung zu dem unbehandelten Öl verstanden. Anschließend wird durch Zugabe von Alkali, z. B. Nat-

ronlauge, ein pH-Wert eingestellt, bei dem die folgende enzymatische Reaktion stattfindet. Idealerweise wird der für die Enzymreaktion optimale pH-Wert von 4 bis 7 eingestellt. Anschließend erfolgt jedoch keine Abtrennung der wässrigen Phase, sondern unmittelbar die Zugabe der Enzyme. Die vorhandenen Schleimstoffe verbleiben also vorerst im Öl bzw. in der Emulsion. Die Abtrennung der wässrigen Phase und damit der Enzyme erfolgt erst nach Einwirkung der

Enzyme auf das (ggf. vorkonditionierte) Rohöl.

[0012] Unter dem Begriff **Phosphatase** werden eine Gruppe von Enzymen verstanden, die aus Phosphorsäureestern oder Polyphosphaten Phosphorsäure abspalten.

[0013] **Phytase** ist der Name für Enzyme, die Phytinsäure hydrolytisch abbauen und somit das gebundene Phosphat freisetzen. Je nachdem, welche Phosphatgruppe abgebaut wird, unterscheidet man zwischen 3-, 4-, 5- und 6-Phytase. Phytasen sind aus Tieren, Pflanzen, Pilzen und Bakterien bekannt; die am besten charakterisierten Phytasen stammen aus Pilzen. Die von vielen Pflanzen und Bakterien gebildete Phytase fungiert als 3-Phytase; diese wird zusammen mit 6-Phytase kommerziell genutzt. 4-Phytase ist eine saure Phosphatase.

[0014] **Saure Phosphatasen** sind Phosphatasen, deren pH-Optimum im sauren pH-Bereich, etwa bei 4,0 bis 5,5, liegt.

[0015] **Phospholipasen** sind Enzyme, die zur Gruppe der Hydrolasen gehören, die die Esterbindung von Phospholipiden hydrolysieren. Phospholipasen werden nach ihrer Regioselektivität bei Phospholipiden in 5 Gruppen eingeteilt:

Phospholipasen A₁ (PLA₁), die die Fettsäure in der *sn*1-Position unter Bildung des 2-Lysophospholipids abspalten.

Phospholipasen A₂ (PLA₂), die die Fettsäure in der *sn*2-Position unter Bildung des 1-Lysophospholipids abspalten.

Phospholipasen C (PLC), die einen Phosphorsäuremonoester abspalten.

[0016] Phospholipasen D (PLD), die die Kopfgruppe abspalten oder austauschen.

[0017] Phospholipasen B (PLB), die die Fettsäure sowohl in der *sn*1-Position als auch in der *sn*2-Position unter Bildung eines 1,2-Lysophospholipids abspalten.

[0018] Unter einer **Acyltransferase** versteht man ein Enzym, dass Acylgruppen, z.B. Fettsäuren aus einem Phospholipid, auf einen geeigneten Akzeptor, z.B. ein Sterol, unter Bildung eines Esters überträgt.

Stand der Technik

[0019] Die Thematik der hydratisierbaren und nicht-hydratisierbaren Phospholipide ist beispielsweise beschrieben in Nielsen, K., Composition of difficultly extractable soy bean phosphatides, J. Am. Oil. Chem. Soc. 1960, 37, 217-219 und A.J. Dijkstra, Enzymatic degumming, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010, 112, 1178-1189. Dabei handelt es sich insbesondere um Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Inositol. Die Behandlung mit verdünnten wässrigen Calcium- und Magnesium-komplexierenden Säuren, wie z. B. Zitronensäure oder Phosphorsäure, führt nach dem Stand der Technik dazu, dass nicht-hydratisierbare Phospholipide in hydratisierbare Phospholipide überführt werden. Man geht davon aus, dass der Mechanismus dieser Reaktion darauf beruht, dass Calciumionen, die verschiedene Phospholipidmoleküle, wie z.B. Phosphatidsäuren an den Phosphatgruppen, überbrücken und stabilisieren, aus dem Öl entfernt werden. Dies führt zur verbesserten Extraktion dieser Phospholipide mit Wasser. Zwar wird durch die wässrige Vorentscheidung und die Behandlung mit wässrigen Säuren bei einigen Ölen eine hinreichend gute Entschleimung erreicht, jedoch gibt es auch schwer entschleimbare Öle, für die diese beiden Extraktionsschritte sehr oft zu einer ungenügenden Reduktion der Schleimstoffe führen. Üblicherweise wünscht man sich hierbei eine Reduktion des Phosphorgehaltes auf 10 oder weniger ppm Phosphor im Öl für Nahrungsmittelanwendungen (nach dem Stand der Technik bestimmt durch ICP/AES-Analyse des Öls). Höhere Anforderungen werden an den Phosphorgehalt des Öls dann gestellt, wenn die Öle beispielsweise zur Herstellung von Biodiesel eingesetzt werden. Dort ist nach der EU-Norm der Phosphorgehalt des Biodiesels auf 5 ppm begrenzt und es ist zweckmäßig, die Phosphorreduktion bereits ölseitig durchzuführen. Weiterhin ist ein besonders niedriger Phosphorgehalt, d. h. ein Phosphorgehalt, der so niedrig wie möglich ist und möglichst 0 beträgt, dann erforderlich, wenn man die Öle in weiteren Behandlungsschritten entweder für den Nahrungsmiteleinsatz hydriert, d. h. ungesättigte in gesättigte Fettsäuren überführt, oder wenn man nach dem NExBTL-Prozess der Firma Neste eine Hydrierung so durchführt, dass als Endprodukt Alkane, sprich ein konventioneller Biodieseltreibstoff, jedoch hergestellt aus Pflanzenöl, erhalten wird. Diese Prozesse stellen, wie vorher angeführt, extrem hohe Anforderungen an einen niedrigen Phosphorgehalt im Öl, und der Einsatz solcher Prozesse wird in dem Maße zunehmen wie Pflanzenöle als Rohstoffe für die chemische Industrie eingesetzt werden.

[0020] Eine weitere Variante stellt das sog. "caustic refining" dar. Dieses Verfahren wird eingesetzt, um möglichst alle Phospholipide zusammen mit freien Fettsäuren aus dem Öl zu entfernen. Dieser Prozess ist beispielsweise in der WO 08/094847 beschrieben. Bei diesem Verfahren wird das rohe oder Wasservorentscheidete Öl zunächst mit geringen Mengen an Zitronensäure oder Phosphorsäure vermischt und intensiv gerührt. Hierbei werden, wie vorher schon erläutert, Salze von nicht-hydratisierbaren Phospholipiden stärker hydratisierbar gemacht. Dann wird verdünnte Natronlauge

hinzugefügt, wobei die Menge so berechnet wird, dass man einen geringen Überschuss gegenüber der zur Neutralisation der freien Fettsäure benötigten Menge erhält. Dadurch werden die Fettsäuresalze gebildet. Durch Absetzen und nachfolgende Zentrifugation wird die Mischung dann aufgetrennt, und man erhält eine wässrige Fettsäurelösung als Rückstand, in der sich auch die Phospholipide befinden. Das Öl wird dann nachfolgend nochmals mit enthärtetem Wasser gewaschen. Die NaOH-Behandlung hat den Nachteil, dass teilweise auch Verseifung des Öles eintritt, wodurch dessen Ausbeute erniedrigt wird.

[0021] Ein weiterer Nachteil der konventionellen ÖlentSchleimungsprozesse liegt darin, dass sowohl die wässrige Vorentschleimung als auch die Behandlung mit wässrigen Säuren zu Ölverlusten führen, die dadurch verursacht sind, dass die in das Wasser überführten Phospholipide Emulgatoren darstellen, die einen zwar geringen, aber doch beträchtlichen Teil des Pflanzenöls in der wässrigen Phase emulgieren, wodurch Pflanzenöl verloren geht. Diese Verluste können im Bereich weniger Prozente bezogen auf das ursprünglich eingesetzte Rohöl liegen. Als Faustregel gilt, dass mit je zwei Molekülen Phospholipid etwa ein Triglyceridmolekül emulgiert wird (beschrieben in WO 08/094847).

[0022] Die sogenannte enzymatische Entschleimung vermeidet mehrere Nachteile der bestehenden Verfahren bzw. verbessert die Extraktionsverfahren weiter. Die enzymatische Entschleimung wird im Stand der Technik durch den Einsatz von Phospholipasen, insbesondere Phospholipase A1 und A2, Phospholipase B, Phospholipase C oder Phospholipase D oder einer Kombination von Phospholipasen herbeigeführt.

[0023] Die Verwendung von Phospholipasen, vor allem Phospholipase A, zur Entschleimung von Rohölen ist beispielsweise in der EP 0513709 B1 (sogenannter Enzymax-Prozess der Firma Lurgi, Frankfurt) geschützt. Es wird davon ausgegangen, dass die Abspaltung einer Fettsäure zu einem Lysolecithin führt, welches eine wesentlich geringere Emulgierkapazität für Öl hat und auch eine wesentlich höhere Wasserlöslichkeit besitzt. Dadurch wird sowohl die Ölausbeute erhöht als auch die Wasserlöslichkeit der schwer hydratisierbaren Phospholipide verbessert. Clausen, Enzymatic oil-degumming by novel microbial phospholipase, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 103 (2001) 333-340, beschreibt die Entwicklung und den Einsatz einer Phospholipase A1 zur enzymatischen ÖlentSchleimung und vergleicht den Einsatz der Phospholipase A1 mit dem Einsatz der Phospholipase A2. Der aktuelle Stand der Technik zur enzymatischen ÖlentSchleimung ist zusammengefasst in A.J. Dijkstra, Recent developments in edible oil processing, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2009, 111, 857-864, und A.J. Dijkstra, Enzymatic degumming, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2010, 112, 1178-1189. Dort werden die Vor- und Nachteile der einzelnen Phospholipasen für die enzymatische ÖlentSchleimung diskutiert und auch die Vorbehandlungsmethoden mit unterschiedlichen Säuren angeführt.

[0024] Ein alternatives Konzept zur ÖlentSchleimung stellen die Systeme der Firma Danisco dar, in denen eine Lipidacyltransferase eingesetzt wird. Dieses Enzym macht aus einem Phospholipid ebenfalls ein Lysophospholipid, überträgt jedoch den Fettsäurerest an ein Sterol in der Ölphase. Die entsprechenden Enzyme und Verfahren zum Einsatz dieser Enzyme sind in der WO 2006/008508 und der WO 2009/081094 beschrieben.

[0025] Phytasen werden auf dem Markt hauptsächlich als Futtermitteladditive vertrieben. Etwa zwei Drittel des Phosphors in pflanzlichen Futtermitteln für Nutztiere liegen gebunden an Phytinsäure oder deren Salze vor und können nur durch die Phytasen gespalten und dadurch für den Phosphatstoffwechsel der Nutztiere zur Verfügung gestellt werden. Die Phytasen kommen jedoch im Magen-Darm-Trakt von Schwein und Geflügel nicht vor. Um die Verwertung des Phosphors aus pflanzlichen Futtermitteln zu verbessern, setzt man deshalb dem Tierfutter Phytasen zu. Solche Phytasen sind beispielsweise in den Patenten EP1066373B1 (Novozymes), EP2295553 (Novozymes), US6475762 (Genencor International), WO9855599 (Gist Brocades); WO9949740 (DSM); WO2004071218 (DSM); WO2011117396 (Novozymes), US2009081331 (BASF); WO2009129489 (Danisco US INC.) beschrieben.

[0026] Typische auf dem Markt erhältliche Phytasen sind die Produkte Natuphos® von der BASF (3-Phytase), Ronozyme® von DSM, Axtra® PHY and Phyzyme® von Danisco.

[0027] Eine weitere Anwendung von Phytasen liegt in der Modifizierung von pflanzlichen Lebensmitteln und ist beispielsweise in der WO2004/071218 und der US2004058049 beschrieben. Für diese Anwendung wird davon ausgegangen, dass die Phytinsäure insbesondere im neutralen Milieu des Darms (schwerlösliche) Salze mit den zweiwertigen Ionen der Mineralstoffe bildet und so deren Resorption herabsetzt. Dies soll insbesondere der Fall für die Ionen von Fe, Zn und Ca der Fall sein. Durch die enzymatische Abspaltung von Phosphatgruppen von der Phytinsäure mittels Phytase können diese Effekte verringert werden. Es wird diskutiert, mit Phytase Lebensmittel vorzubehandeln um die darin enthaltenden Mineralien besser verfügbar/resorbierbar zu machen. So beschreibt die US2004058049A1 den Zusatz von Phytasen in Soft Drinks.

[0028] Aufgrund der weltweiten Zunahme des Verbrauchs an Speiseöl und der immer stärker werdenden Nutzung von Pflanzenölen als Rohstoffe für die chemische Industrie und als Treibstoff besteht ständig weiterer Bedarf, die Entschleimung von Pflanzenölen und insbesondere die enzymatische Entschleimung von Pflanzenölen weiter zu verbessern und die Ölausbeute bei der Entschleimung zu erhöhen.

Aufgabe der Erfindung

[0029] Die Erfinder der vorliegenden Anmeldung haben sich die Aufgabe gestellt, ein alternatives Verfahren zur en-

zymatischen Entschleimung von Triglyceriden zu entwickeln, mit denen der Phosphorgehalt des zu entschleimenden Öls verringert, die Ölausbeute erhöht und/oder die Reaktionsgeschwindigkeit der enzymatischen Entschleimung erhöht wird. Gleichzeitig soll dieses Verfahren eine wirtschaftliche Durchführung im großtechnischen Maßstab ermöglichen.

[0030] Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Gewinnung von Lecithin aus Triglyceriden, insbesondere aus rohem Soja-, Sonnenblumen- oder Rapsöl, mit hoher Ausbeute, wobei der Gehalt an Öl im gewonnenen Lecithin möglichst gering ist, oder mit anderen Worten, die Entölung des Lecithins bzw. die Verringerung des Ölgehalts im Pflanzenölschleim.

Lösung der Aufgabe

[0031] Es wurde nun überraschend gefunden, dass eine (saure) Phosphatase und/oder eine Phytase besonders geeignet sind, um Triglyceride zu entschleimen, bzw. Lecithin zu entölen. Der Einsatz von sauren Phosphatasen bzw. Phytasen in der enzymatischen ÖlentSchleimung war bisher nicht bekannt. Bis jetzt waren lediglich Anwendungen dieser Enzyme in rein wässrigen Systemen bekannt, nicht aber in Öl-Wasser-Zweiphasensystemen wie sie in der wässrigen ÖlentSchleimung verwendet werden. Für den Einsatz in der enzymatischen ÖlentSchleimung sind insbesondere solche Phytasen geeignet, die zur Behandlung von Lebensmitteln bereits eingesetzt werden.

[0032] Die Verwendung von sauren Phosphatasen und/oder Phytasen zur enzymatischen ÖlentSchleimung ist im Hinblick auf einen effizienteren, kostengünstigeren Prozess besonders vorteilhaft, da Phytasen kostengünstige Bulkenzyme sind.

[0033] Die erfindungsgemäße Aufgabe wird durch ein Verfahren zur enzymatischen Entschleimung von Triglyceriden oder zur Verringerung des Ölgehalts im Pflanzenölschleim, der bei der ÖlentSchleimung anfällt, gelöst, welches Verfahren folgende Schritte umfasst:

Zunächst werden die Triglyceride oder der Pflanzenölschleim, der bei der ÖlentSchleimung anfällt, mit mindestens einer Phosphatase in Kontakt gebracht (Schritt a). Anschließend werden, wenn Triglyceride als Ausgangsmaterial verwendet werden, die Schleimstoffe von den Triglyceriden getrennt (Schritt b1). Bevorzugt werden rohe Pflanzenöle als Triglyceride eingesetzt.

[0034] Alternativ kann anstelle der Triglyceride als Ausgangsmaterial auch Pflanzenölschleim eingesetzt werden, der bei der Entschleimung von Pflanzenölen anfällt, sei es durch eine Entschleimung nach herkömmlichen oder dem erfindungsgemäßen Verfahren. Der Pflanzenölschleim wird gemäß Schritt a) mit der mindestens einen Phosphatase in Kontakt gebracht und anschließend nach Schritt b2), der analog zu b1) durchgeführt wird, in eine wässrige, Lecithinhaltige Phase und eine Öl-haltige Phase getrennt. Die Schleimphase bzw. der Pflanzenölschleim wird insbesondere bei der Gewinnung von Lecithin eingesetzt.

[0035] Vorzugsweise stellt die mindestens eine Phosphatase eine saure Phosphatase oder eine Phytase oder eine Kombination aus beiden Enzymen dar.

[0036] Bei der Sauren Phosphatase handelt es sich vorzugsweise um ein oder mehrere Enzyme der Enzymklasse EC 3.1.3.2. Die Enzyme dieser Klasse sind in der Regel substratspezifisch, spalten von einer Vielzahl von organischen Substraten Phosphatgruppen ab und weisen ein pH-Optimum von kleiner oder gleich 7, bevorzugt von kleiner oder gleich 6,5, besonders bevorzugt von kleiner oder gleich 6 auf. Die Untergrenze des pH-Werts liegt vorzugsweise bei 3,0, stärker bevorzugt bei 3,5. In diesem pH-Bereich ist eine schnelle Reaktionsführung möglich. Diese Enzyme sind weit verbreitet und kommen in Pflanzen, Tieren, Pilzen und Bakterien vor. Saure Phosphatasen können aber auch aus Milch wie z.B. Säugetiermilch isoliert werden. Purple Acid Phosphatases (Abkürzung: PAPs) sind eine eigene Klasse von sauren Phosphatasen, die zweikernige Übergangsmetallzentren enthalten und in Lösung eine violette Färbung zeigen. Ein typischer Vertreter dieser Klasse ist die Purple Acid Phosphatase aus der Süßkartoffel, wie Sie beispielsweise von Kusudo T, Sakaki T, Inouye K. Purification and Characterization of Purple Acid Phosphatase PAP1 from Dry Powder of Sweet Potato, Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003 67(7):1609-11 beschrieben ist. Auch PAPs sind weit verbreitet und können auch aus der Sojabohne, aus Reis, aus Zwiebeln und Red Kidney Beans isoliert werden. Daneben können solche Enzyme auch aus Bakterien oder Säugetieren isoliert werden.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform stammt die saure Phosphatase aus Pflanzen, insbesondere aus der Süßkartoffel, aus Weizenkeimen oder Soja, aus Säugetiermilch oder aus Pilzen, Hefen oder Bakterien.

[0038] Bei der im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Phytase handelt es sich um eine einzelne Phytase oder ein Gemisch aus zwei oder mehreren Phytasen. Bevorzugt handelt es sich um eine sogenannte 3-Phytase (Enzymklasse EC 3.1.3.8), 4-Phytase (Enzymklasse EC 3.1.3.26), 5-Phytase (Enzymklasse EC 3.1.3.72) oder 6-Phytase (Enzymklasse EC 3.1.3.26). (Literaturangabe: Enzymes in Industry, Wolfgang Aehle Editor, Wiley VCH, Weinheim, Second Edition, 2004 Chapter 5 Industrial Enzyme, p. 216.) Die Ziffern beziehen sich auf die Position der Phosphatgruppen in der Phytinsäure, die durch die Einwirkung der Phytasen als erste abgespalten werden. Danach werden abhängig von der Reaktionszeit und den Reaktionsbedingungen weitere Phosphatgruppen abgespalten. Phytasen sind Bulkenzyme, die

in großem Maßstab industriell hergestellt werden.

[0039] Vorzugsweise stammt die Phytase aus folgenden Organismen: Pflanzen, Bakterien, Hefen und Pilze.

[0040] Insbesondere stammt die Phytase aus Mais, Sojabohne, Weizenkleie, *Bacillus* Spezies, *Escherichia coli* Spezies, *Klebsiella* Spezies, *Pseudomonas* Spezies, *Aspergillus* Spezies, *Trichoderma* Spezies, *Rhizopus* Spezies, *Saccharomyces* Spezies, *Pichia* Spezies, *Penicillium* Spezies, *Schwanniomycetes* Spezies, *Arxula adenivorans*.

[0041] Die im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzten Phytasen haben ein pH Optimum bei einem pH Wert von kleiner oder gleich 8, bevorzugt kleiner oder gleich 7; ganz besonders bevorzugt kleiner oder gleich 6. Die Untergrenze des pH-Werts liegt vorzugsweise bei 3,0, stärker bevorzugt bei 3,5.

[0042] In einer weiteren Ausführungsform wird neben der mindestens einen Phosphatase zusätzlich ein Phospholipid-spaltendes Enzym eingesetzt.

[0043] Vorzugsweise stellt das Phospholipid-spaltende Enzym eine Phospholipase A1, Phospholipase A2, Phospholipase B, Phospholipase C, Phospholipase D oder Acyltransferase dar. Besonders bevorzugt wird das Phospholipid-spaltende Enzym aus der Phospholipase A1, Phospholipase A2 oder Phospholipase B ausgewählt.

[0044] Vorzugsweise wird die Phospholipase A1 aus folgenden Spezies gewonnen: *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* spezies, *Trichoderma reesei*, *Pichia pastoris*, Schweinepankreas oder Rinderpankreas. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt die Phospholipase A1 aus *Thermomyces lanuginosus*.

[0045] Vorzugsweise und unabhängig wird die Phospholipase A2 aus folgenden Quellen hergestellt: Schweinepankreas, Rinderpankreas, *Streptomyces violaceoruber*, *Naja mossambica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma reesei*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* oder *Pseudomonas* spezies.

[0046] Vorzugsweise und unabhängig wird die Phospholipase B aus folgenden Spezies gewonnen: *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Pichia pastoris*, *Trichoderma reesei*, *Pseudomonas* spezies, Schweinepankreas oder Rinderpankreas.

[0047] Vorzugsweise und unabhängig wird die Phospholipase C aus folgenden Spezies gewonnen: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris* oder *Pseudomonas* spezies.

[0048] Vorzugsweise und unabhängig wird die Phospholipase D aus folgenden Spezies gewonnen: Schweinepankreas, Rinderpankreas, Kohl, Erdnuss, *Streptomyces* Spezies, *Streptomyces chromofuscus*, *Streptomyces violaceoruber*, *Naja mossambica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Fusarium oxysporium*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma reesei*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* oder *Pseudomonas* spezies.

[0049] Besonders bevorzugt wird die Phospholipase A1 aus *Thermomyces lanuginosus* oder *Fusarium oxysporium* ausgewählt, und/oder unabhängig davon wird die Phospholipase A2 aus Schweinepankreas, Rinderpankreas, *Streptomyces violaceoruber*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger* oder *Naja mossambica* ausgewählt, und/oder unabhängig davon wird die Phospholipase C aus *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Pichia pastoris* oder *Listeria monocytogenes* ausgewählt.

[0050] Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren bei einem der wässrigen Phase der Öl-Wasser-Mischung von kleiner 7, bevorzugt von kleiner 6, besonders bevorzugt von kleiner 5 durchgeführt. Die Untergrenze des pH-Wert liegt vorzugsweise bei 3,0, stärker bevorzugt bei 3,5. Wenn zusätzlich zur Phosphatase eine Phospholipase verwendet wird, wird das erfindungsgemäße Verfahren bei einem pH-Wert von 4,0 bis 5,5 durchgeführt.

[0051] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens liegt das Verhältnis der Phosphatase zu dem Phospholipid-spaltenden Enzym im Bereich von 0,01 : 6 units/g Öl bis 6 : 0,01 units/g Öl.

[0052] Vorzugsweise liegen die Phosphatase und/oder das Phospholipid-spaltende Enzym in geträgerter Form vor.

[0053] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden Sojaöl, Rapsöl, Canolaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Palmöl, Jatrophaöl, Leindotteröl oder Baumwollsaatöl als Öle eingesetzt.

[0054] In einer weiteren Ausführungsform wird anstelle des Pflanzenöls ein wässriger Pflanzenölschleim, der bei der Ölentseimung von einem der vorstehend genannten Öle anfällt, eingesetzt.

[0055] Insbesondere wird Sojaöl mit einer Phytase, vorzugsweise einer 3-Phytase oder 6-Phytase, und ggf. zusätzlich mit einer Phospholipase A1 entschleimt. Gemäß einer Ausführungsform wird Rapsöl mit einer sauren Phosphatase und ggf. zusätzlich mit einer Phospholipase A1 entschleimt.

[0056] Vorzugsweise wird vor dem in-Kontakt-Bringen gemäß Schritt a) das rohe Pflanzenöl mit Wasser und/oder Säure in Kontakt gebracht. Diese Maßnahme ist als Vorkonditionierung bekannt, wenn vor Durchführung des Schrittes a) keine Trennung in Wasser bzw. Öl erfolgt, bzw. als Vorentseimung, wenn vor Durchführung des Schrittes a) eine Trennung in Wasser bzw. Öl erfolgt.

[0057] In bevorzugter Weise wird eines der Enzyme, wie vorstehend definiert, zur Erhöhung der Ölausbeute in einem Verfahren zur wässrigen Öl-Entseimung, zur Verringerung der Emulgierbarkeit von Pflanzenölen in wässrigen Phasen,

oder zur Entölung von Pflanzenölschleim bzw. Lecithin verwendet.

[0058] Generell können auch eine Kombination aus zwei oder mehr der vorgenannten Phosphatase-Enzyme eingesetzt werden, die aus gleichen oder verschiedenen Quellen stammen können. Die Enzyme können dabei von einem beliebigen Organismus (z.B. auch isoliert aus einem thermophilen Organismus) oder einer synthetischen Quelle stammen. Das Gleiche gilt für die Phospholipid-spaltenden Enzyme bzw. deren Mischungen mit Phosphatasen.

[0059] Das Verfahren der vorliegenden Erfindung ist vorteilhaft, da durch den Einsatz der Phosphatase-Enzyme, insbesondere durch das relativ kostengünstige Bulk-Enzym Phytase bzw. durch saure Phosphatasen, die Spaltung von Komponenten, die in der Schleimphase vorhanden sind, erfolgen kann. Überdies verbessert die Phosphatase die Wirkung des Phospholipid-spaltenden Enzyms, wenn dieses zusätzlich zur Phosphatase eingesetzt wird. Es wird angenommen, dass durch den Einsatz der Phosphatase, insbesondere durch Phytase und/oder saure Phosphatase, eine Erniedrigung der Viskosität der Schleimphase, eine Erhöhung der Beweglichkeit der Phospholipide oder eine bessere Zugänglichkeit der Phospholipide erreicht werden kann. Eine zusätzliche Steigerung der vorstehend beschriebenen Wirkungen ergibt sich, wenn zusätzlich Phospholipid-spaltende Enzyme eingesetzt werden.

[0060] Es wurde überraschend gefunden, dass die Entschleimung von Triglyceriden mit mindestens einer Phosphatase durchgeführt werden kann; insbesondere eignen sich Phytase und saure Phosphatase zu diesem Zweck. Es können zwei oder mehrere Phytasen eingesetzt werden, die aus gleichen oder verschiedenen Quellen stammen können; sie können z.B. auch aus einem thermophilen Organismus isoliert werden oder aus einer synthetischen Quelle stammen. Für die sauren Phosphatasen und deren Mischung mit Phytase(n) gilt das Gleiche sinngemäß.

[0061] Ferner wurde gefunden, dass sich Triglyceride effizient entschleimen lassen, wenn neben der Phosphatase vorzugsweise ein weiteres Phospholipid-spaltendes Enzym zugegeben wird. Bei dem Phospholipid-spaltenden Enzym kann es sich um eine Phospholipase handeln, die in der Lage ist, entweder einen Fettsäurerest oder einen Phosphatidylrest oder eine Kopfgruppe von einem Phospholipid abzuspalten. Überdies kann es sich auch um eine sogenannte Acyltransferase handeln, bei der die Abspaltung des Fettsäurerests aus einem Phospholipid mit einer Übertragung dieses Restes auf ein freies Sterol unter Esterbildung in der Ölphase verbunden ist. In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, bei dem ein Phospholipid-spaltendes Enzym aus der Phospholipase A1, Phospholipase A2, Phospholipase C, Phospholipase B, Phospholipase D oder Acyltransferase ausgewählt wird.

[0062] Typische Enzyme aus dieser Gruppe sind die Lecitase® Ultra von Novozymes®, eine Phospholipase A1; Lecitinase® von Novozymes, eine Phospholipase A2; Rohalase® MPL, eine Phospholipase A2 von AB Enzymes, Darmstadt(D); Gumzyme TM, eine Phospholipase A2 von DSM, Purifine®, eine Phospholipase C von DSM,; Lysomax®, eine Acyltransferase der Firma Danisco. Dabei kann innerhalb der Gruppe der Phospholipid-spaltenden Enzyme auch eine Kombination aus zwei oder mehr der vorgenannten Phospholipid-spaltenden Enzyme eingesetzt werden, welche aus gleichen oder unterschiedlichen Quellen stammen können. Die Enzyme können dabei von einem beliebigen Organismus (z. B. auch isoliert aus einem thermophilen Organismus) oder einer synthetischen Quelle stammen.

[0063] In einer bevorzugten Ausführungsform kann eine Zugabe von Wasser bzw. einer wässrigen Säurelösung und ggf. von Alkali zur Neutralisierung der Säure zum Rohöl im Sinne einer **Vorkonditionierung** erfolgen, jedoch unterbleibt die Abtrennung der wässrigen Phase vor der Zugabe der Enzyme (im Sinne einer Naßvorentschleimung). Durch den Verzicht auf den Abtrennungsschritt vor der Zugabe der Enzyme ist eine Steigerung der Ölausbeute möglich. Eine Steigerung der Ölausbeute um einen Prozentpunkt hat eine enorme wirtschaftliche Bedeutung, da dieses Prozent ca. 400.000 t Öl entspricht, bezogen auf die jährliche Produktion von Sojaöl. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt somit die unmittelbare Verwendung von Rohölen aus Soja bzw. Raps mit Phosphorgehalten von 500 bis 1.500 ppm Phosphor. Überdies stellt es eine Vereinfachung des Verfahrens dar, weil der Trennschritt vor Enzymzugabe entfällt.

[0064] Bei der Zugabe von Wasser ist Folgendes zu bedenken: Um die Phosphatide aus dem Öl zu entfernen, ist ca. 1 Vol.-% Wasser, bezogen auf das Ölvolumen, erforderlich, um ca. 400 ppm Phosphor zu entfernen. Nach dieser Überlegung ist die Zugabe von ca. 5 Vol.-% Wasser, bezogen auf das Ölvolumen, ausreichend, um auch ein Öl mit hohem Phosphorgehalt vollständig vom Phosphor zu befreien. Allerdings führt eine solche Vorgehensweise dazu, dass das Verfahren unwirtschaftlich wird, weil stets größere Reaktionsvolumina vorgehalten werden müssen. Überdies bedingt ein größeres zugegebenes Wasservolumen einen höheren Trennaufwand und eine geringere Ölausbeute; weniger zugegebenes Wasser bedeutet somit auch eine höhere Ölausbeute. Gemäß einer speziellen Ausführungsform der Ölbehandlung wird daher nicht mehr als 4 Vol.-% Wasser, vorzugsweise nicht mehr als 3 Vol.-% Wasser, jeweils bezogen auf das Ölvolumen, zum Öl gegeben.

[0065] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden in dem Raffinationschritt - abgesehen von den im Öl bereits vorhandenen Emulgatoren, wie z.B. Lecithin - keine zusätzlichen Emulgatoren, wie z.B. Natriumdocecylsulfat (SDS), zugegeben.

[0066] In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Enzymaktivität der Phosphatase(n) im Bereich von 0,01 bis 10 units/g Öl gewählt, bevorzugter im Bereich von 0,1 bis 6 units/g Öl, besonders bevorzugt im Bereich von 0,2 bis 5 units/g Öl. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Enzymaktivität der Phospholipid-spaltenden Enzyme im Bereich von 0,01 bis 6 units/g Öl, bevorzugt 0,1 bis 3 units/g Öl und besonders bevorzugt im Bereich von 0,2 bis 2,5 units/g Öl gewählt und am meisten bevorzugt im Bereich von 0,25 bis 1 units/g Öl. (Unit: Internationale Einheit für

Enzymaktivität; 1 Unit entspricht dem Substratumsatz von 1 $\mu\text{mol/min}$).

[0067] Vorzugsweise wird das Verhältnis der Enzymaktivität der Phosphatase zur Enzymaktivität der Phospholipid-spaltenden Enzyme im Bereich von 0,01 : 6 units/g Öl bis 6 : 0,01 units/g Öl liegen, bevorzugt im Bereich von 0,1 : 4 units/g Öl bis 4 : 0,1 units/g Öl. Dabei ist es auch bevorzugt, wenn der Anteil der Phosphatase(n) und der Anteil der phospholipid-spaltenden Enzyme gleich ist, wenn beispielsweise beide Anteile im Bereich von 0,1 bis 5 units/g Öl, bevorzugt im Bereich 0,2 bis 3 units/g Öl gewählt werden.

[0068] Gemäß einer Ausführungsform dieser Erfindung wird die Ölentseimung bzw. die Entölung des Pflanzenschleims bei saurem pH-Wert durchgeführt. Ein bevorzugter pH-Wert des wässrigen Teils des Öl-Wasser - Mischung liegt im Bereich von 3,0 bis 7,5, bevorzugt von 3,5 bis 6,5, insbesondere bevorzugt von 3,8 bis 6,0. Wenn der pH-Wert innerhalb dieses Bereichs liegt, kann eine schnelle Reaktionsführung beobachtet werden.

[0069] Die Phosphatase-Enzyme und/oder Phospholipid-spaltenden Enzyme können beispielsweise gefriergetrocknet und in einem Enzympuffer gelöst verwendet werden. Als Beispiele können Citratpuffer 0,01 - 0,25 M, pH 3,8-7,5, vorzugsweise 0,1 M Citratpuffer bei pH 5,0, oder Acetatpuffer 0,01 - 0,25 M, pH 3,8-7,5, vorzugsweise 0,1 M Acetatpuffer bei pH 4,0, genannt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Enzyme in Wasser oder Enzympuffer aufgenommen und dem Rohöl zugesetzt. Um eine bessere Löslichkeit der Enzyme - insbesondere in den Phospholipide enthaltenden Mischungen - zu erreichen, ist auch der Zusatz von organischen Lösungsmitteln möglich. Diese finden Anwendung z. B. in der Auftrennung der Phospholipide und sind in der Literatur beschrieben. Bevorzugt verwendet werden unpolare organische Lösungsmittel, wie z. B. Hexan, oder Aceton oder Mischungen, bevorzugt in einer Menge von 1 bis 30 Gew.-% (Beispiele möglicher Lösungsmittel sind beschrieben in der EP 1531182 A2).

[0070] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden das Phosphatase-Enzym und/oder das Phospholipid-spaltende Enzym in geträgerter Form eingesetzt, wobei die Enzyme adsorptiv oder kovalent auf einem Trägermaterial gebunden sind. Bevorzugte Trägermaterialien sind anorganische Trägermaterialien, wie z. B. Kieselgele, Fällungskieselsäuren, Silikate oder Alumosilikate, und organische Trägermaterialien, wie z. B. Methacrylate oder Ionentauscherharze. Die Trägermaterialien erleichtern die Abtrennbarkeit und Wiederverwertbarkeit der (relativ teuren) Enzyme aus der Öl-Wasser-Emulsion in einem folgenden Verfahrensschritt und tragen zur Wirtschaftlichkeit des Verfahrens bei.

[0071] In besonders bevorzugten Ausführungsformen umfasst das Phosphatase-Enzym mindestens ein Enzym, das aus der Gruppe ausgewählt wird, welche aus Phytase, saurer Phosphatase, alkalischer Phosphatase, und Phosphatidinsäure-spezifischer Phosphatase besteht. Das Phospholipid-spaltende Enzym umfasst vorzugsweise mindestens ein Enzym ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phospholipase A1, Phospholipase A2, Phospholipase B, Phospholipase C, Phospholipase D, und Acyltransferase.

[0072] Vorzugsweise werden gefriergetrocknete Enzyme eingesetzt, die in einem Puffer, ausgewählt aus Citratpuffer oder Acetatpuffer, vorliegen. Es ist zudem bevorzugt, wenn mindestens das Phosphatase-Enzym adsorptiv oder kovalent auf einem Träger gebunden vorliegt.

[0073] Die Erfinder des Verfahrens haben überraschend gefunden, dass Phosphatase-Enzyme, insbesondere saure Phosphatase und/oder Phytase, geeignet sind, die Emulgierbarkeit von Pflanzenöl in wässrigen Phasen wirkungsvoll und effektiv zu verringern. Zusätzlich kann dieser Effekt durch eine Kombination der Phosphatase-Enzyme mit Phospholipid-spaltenden Enzymen gesteigert werden. Das Verfahren kann vorteilhaft für die Entseimung von rohem Pflanzenöl oder auch zur Aufbereitung der Schleimstoffe eingesetzt werden. Die Schleimstoffe können dabei beispielsweise durch ein herkömmliches Entseimungsverfahren oder durch das erfindungsgemäße Verfahren, wenn es zur Entseimung von rohem Pflanzenöl eingesetzt wird, erhalten werden.

[0074] Es können Triglyceride, vorzugsweise rohe oder unbehandelte Triglyceride, als Ausgangsmaterial eingesetzt werden, die mit dem Phosphatase-Enzym, ggf. in Kombination mit Phospholipid-spaltenden Enzymen, in Kontakt gebracht werden (Schritt a) und anschließend in Schleimstoffe und (entschleimte) Triglyceride getrennt werden; (Schritt b1). In diesem Fall wird das erfindungsgemäße Enzym **vor** dem Trennschritt b1) zugegeben.

[0075] Alternativ zu den Triglyceriden kann ein Pflanzenölschleim, der z.B. durch ein herkömmliches Entseimungsverfahren, wie z.B. durch Behandlung mit Wasser oder wässriger Säure, optional gefolgt von einer Neutralisation mit Lauge, erhalten wurde, mit dem Phosphatase-Enzym in Kontakt gebracht werden (Schritt a) und anschließend in eine wässrige Lecithin-haltige Phase und eine Ölphase aufgetrennt werden; (Schritt b2). Im Fall der Abtrennung des Pflanzenölschleims nach einem herkömmlichen Verfahren, wird das Phosphatase-Enzym **nach** der Abtrennung des Pflanzenölschleims diesem zugesetzt. Mit dieser Vorgehensweise kann folglich aus Pflanzenölschleim sowohl weiteres Öl als auch entöltes Lecithin gewonnen werden. Die Phosphatasen, ggf. in Kombination mit den Phospholipasen A1, A2 oder B, können zur Entölung von Pflanzenölschleim eingesetzt werden.

[0076] Beiden Alternativen gemeinsam sind die Verfahrensschritte des in-Kontakt-Bringens der Ausgangsmaterialien mit dem erfindungsgemäßen Enzym und die anschließende Trennung in eine wässrige und eine ölige Phase; oder verkürzt ausgedrückt: die Gewinnung von lecithinfreiem Öl und ölfreiem Lecithin durch Trennung mittels Enzymen.

[0077] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verringerung der Emulgierbarkeit von Triglyceriden in wässrigen Phasen umfassend die Schritte

- a) in-Kontakt-Bringen der rohen Triglyceride mit einem oder mehreren Enzymen wie vorstehend beschrieben; und
- b) Abtrennen der Schleimstoffe von den Triglyceriden.

[0078] Erstaunlicherweise wurde gefunden, dass es gelingt, durch den Einsatz von Phosphatase-Enzymen die Ölausbeute der Reaktion zu erhöhen. Des Weiteren wurde überraschend gefunden, dass durch die Kombination von Phosphatase-Enzymen mit Phospholipid-spaltenden Enzymen die Ölausbeute der Reaktion noch weiter gesteigert wird. Überdies wird durch die Zugabe der Phosphatasen der Phospholipidgehalt des Rohöls gegenüber dem reinen Einsatz von Phospholipid-spaltendem Enzym (im Stand der Technik) weiter abgesenkt, die Reaktionsgeschwindigkeit bei der enzymatischen Entschleimung erhöht, und/oder die Abtrennbarkeit der gebildeten Schleimphase verbessert.

[0079] Durch den Einsatz von Phosphatase-Enzymen, insbesondere durch saure Phosphatase und/oder Phytase, ist es möglich, in Verbindung mit Phospholipid-spaltenden Enzymen, die Dosierung der Phospholipid-spaltenden Enzyme, wie z. B. der Phospholipase A1, A2 oder B, gegebenenfalls kombiniert mit Phospholipase C, zu verringern und so neben den oben angeführten Vorteilen für den Prozess auch Kosten zu sparen.

[0080] Das "in-Kontakt-Bringen" kann im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens auf jede Weise erfolgen, die dem Fachmann als für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet bekannt ist. Bevorzugte Art des in-Kontakt-Bringens ist dabei ein Vermischen des Rohöls und der Enzyme.

[0081] Nach dem Mischen des Rohöls mit dem Enzym bzw. den Enzymen wird die Mischung aus Rohöl und Enzym bevorzugt gerührt, besonders bevorzugt mit einem Flügelrührer bei 200 bis 800 U/min, bevorzugt 250 bis 600 U/min und am meisten bevorzugt bei 300 bis 500 U/min.

[0082] Die Temperatur der Mischung liegt während des in-Kontakt-Bringens bevorzugt im Bereich von 15 bis 99 °C, bevorzugter im Bereich von 20 bis 95 °C, weiter bevorzugt von 22 bis 80 °C, ebenfalls bevorzugt von 30 bis 80 °C, weiter bevorzugt von 32 bis 80 °C und am meisten bevorzugt von 35 bis 80 °C. Dabei soll gemäß einer Ausführungsform die Temperatur der Mischung immer so gewählt werden, dass die Denaturierungstemperatur der Enzyme nicht überschritten wird. Bevorzugt liegt die Temperatur der Mischung mindestens 5 °C unter der Denaturierungstemperatur der Enzyme bzw. der niedrigsten Denaturierungstemperatur der Enzyme. Bei Einsatz von Enzymen, die aus thermophilen Organismen isoliert wurden, sind generell höhere Temperaturen zu bevorzugen. Werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein oder mehrere thermostabile Enzyme eingesetzt, so liegt die Prozesstemperatur bevorzugt im Bereich von 80 bis 120 °C, bevorzugter im Bereich von 85 bis 100 °C. Die Verwendung thermostabiler Enzyme hat den Vorteil, dass somit eine erhöhte Verfahrenstemperatur gewählt werden kann, wodurch die Viskosität des Pflanzenöls verringert wird und das Verfahren insgesamt verkürzt werden kann - auch aufgrund einer erhöhten Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme. Des Weiteren erübrigt sich im Falle einer Vorbehandlung, die vorteilhaft ebenfalls bei erhöhten Temperaturen durchgeführt wird, ein anschließendes Abkühlen unterhalb einer niedrigeren Denaturierungstemperatur der eingesetzten Enzyme. Insgesamt führt die Verwendung thermostabiler Enzyme damit zur einer Verfahrensverkürzung und Kostensenkung.

[0083] Die Dauer des in-Kontakt-Bringens liegt dabei bevorzugt im Bereich von 1 Minute bis 12 Stunden, bevorzugter von 5 Minuten bis 10 Stunden, ebenfalls bevorzugt von 10 Minuten bis 6 Stunden, weiter bevorzugt von 15 Minuten bis 4 Stunden.

[0084] Der pH-Wert des wässrigen Anteils der Mischung aus Öl und Enzym liegt während des in-Kontakt-Bringens bevorzugt im Bereich von pH 3 bis pH 7,5, bevorzugter im Bereich von pH 3,5 bis pH 6,5 und besonders bevorzugt im Bereich von pH 3,8 bis pH 6,0.

[0085] Das Abtrennen der Schleimstoffe gemäß Schritt b) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann auf jede Weise erfolgen, die dem Fachmann als für den erfindungsgemäßen Zweck geeignet bekannt ist, bevorzugt erfolgt die Abtrennung jedoch über Zentrifugation oder Filtration, wobei Zentrifugation bevorzugt ist. Bei der Zentrifugation erfolgt eine Phasentrennung der Mischung, sodass das behandelte Pflanzenöl, die Schleimstoffe und die Enzymzusammensetzung in separaten Phasen vorliegen, die leicht voneinander getrennt werden können. In Bezug auf die Abtrennung ist es unerheblich ob von Triglyceriden, insbesondere rohen Pflanzenölen, nach Schritt b1) ausgegangen wird, oder von Pflanzenölschleim nach Schritt b2), da beide Alternativen ein identisches Verfahren erfordern. Die voneinander getrennten Produkte unterscheiden sich lediglich in ihrer Menge, nicht jedoch in ihrer chemischen Natur.

[0086] In einer bevorzugten Ausführungsform wird dabei die Phase enthaltend die Schleimstoffe sowie die Phase, welche das Enzym enthält, von dem behandelten Öl abgetrennt. Besonders bevorzugt ist es dabei, wenn gleichzeitig mit den Schleimstoffen sämtliche Enzyme abgetrennt werden.

[0087] Die Enzyme können nach der Abtrennung regeneriert bzw. gereinigt und beispielsweise in einem neuen Aufreinigungsverfahren eingesetzt werden. Auch in diesem Fall ist es ebenfalls günstig, wiederum mit den erfindungsgemäßen Enzymen zu arbeiten, entweder, indem man die Phosphatase-Enzyme direkt in Kombination mit geträgerten Phospholipasen oder Lipidacyltransferasen einsetzt, oder indem man das Enzym erfindungsgemäß einsetzt, um den Pflanzenölschleim, der z.B. an geträgerten Phospholipasen haftet, zu entfernen, um die geträgerten Enzyme besser in einem neuen Verfahren wiederverwenden zu können.

[0088] Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft zudem ein Verfahren wie vorste-

hend beschrieben, weiter umfassend den Schritt

c) erneutes in-Kontakt-Bringen der Triglyceride gemäß Schritt a) mit dem bzw. den erfindungsgemäß verwendeten Enzym(en) .

[0089] Das in-Kontakt-Bringen erfolgt dabei bevorzugt unter den gleichen Bedingungen wie vorstehend für Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens beschrieben. Dabei werden in einer besonders bevorzugten Ausführungsform die Phosphatase-Enzyme und/oder die Phospholipid-spaltenden Enzyme vor dem erneuten in-Kontakt-Bringen einer Regeneration oder Reinigung unterzogen.

[0090] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das rohe Pflanzenöl vor dem in-Kontakt-Bringen gemäß Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens mit Wasser und/oder Säure in Kontakt gebracht. Bevorzugte Säuren sind dabei Calcium- und Magnesium-komplexierende Säuren allein oder in Kombination, wie z. B. Zitronensäure und Phosphorsäure. Man spricht hier von einer sogenannten "Vorentscheidung".

[0091] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt das in-Kontakt-Bringen mit Wasser bei einer Temperatur zwischen 30°C bis 90°C für 15 bis 60 Minuten, bevorzugt 30 bis 60 Minuten, wobei eine Temperatur von 35 bis 85 °C bevorzugt und eine Temperatur von 40 bis 80 °C besonders bevorzugt ist. Das in-Kontakt-Bringen mit Säure, insbesondere Zitronensäure oder Phosphorsäure, erfolgt im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt bei einer Temperatur zwischen 30°C bis 90°C für 5 bis 60 Minuten, bevorzugt 15 bis 60 Minuten, wobei eine Temperatur von 35 bis 85 °C bevorzugt und eine Temperatur von 40 bis 80 °C besonders bevorzugt ist. In einer weiteren möglichen Ausführungsform wird anschließend die säurehaltige, wässrige Phase z. B. durch Zentrifugation abgetrennt. In einer bevorzugten Ausführungsform wird nach der Säurebehandlung ein Neutralisationsschritt mit einer entsprechenden Base erfolgen, um einen pH-Wert von 3,5 bis 8,0, bevorzugt von 4 bis 7, zu erreichen. Anschließend kann das Öl von den erhaltenen Schleimstoffen durch z. B. Zentrifugation oder Filtration abgetrennt werden. Ebenfalls möglich und bevorzugt ist es gemäß dem Verfahren der vorliegenden Erfindung, wenn das bzw. die Enzyme direkt zu dem Pflanzenöl gegeben werden, ohne dass zuvor ein Abtrennungsschritt durchgeführt wurde.

[0092] Vor Zusatz der Phosphatase(n) und ggf. der Phospholipase(n) soll bevorzugt dafür gesorgt werden, dass die Reaktionstemperatur den optimalen Temperaturbereich des Enzyms nicht übersteigt, um ein Denaturieren des Enzyms zu verhindern. Temperaturen zwischen 35 bis 75 °C, besser zwischen 45 bis 70 °C, sind geeignet, wobei durch Einsatz von Enzymen aus thermophilen Organismen, also besonders temperaturstabilen Enzymen, ein Einsatz bei 80 bis 100 °C möglich ist, so dass zwischen dem in-Kontakt-Bringen des rohen Pflanzenöls mit Wasser und/oder Säure und dem in-Kontakt-Bringen mit dem Enzym bzw. den Enzymen keine Temperaturabsenkung erfolgen muss. Eine Erhöhung der Temperaturstabilität kann auch durch eine Immobilisierung der Enzyme erreicht werden. Da viele Enzyme eine gewisse Toleranz gegenüber organischen Lösungsmitteln aufweisen (Faber, K., Biotransformations in Organic Chemistry (2001), Springer-Verlag, Heidelberg), können im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch dementsprechend vorbehandelte Öle oder Schleime mit den Enzymen behandelt werden.

[0093] In Ausführungsformen, die den Rahmen der vorliegenden Erfindung in keiner Weise beschränken, umfasst das Verfahren der vorliegenden Erfindung die Schritte:

Allgemeine Ausführungsform A)

[0094]

a) in-Kontakt-Bringen der Triglyceride, vorzugsweise von rohem Sojaöl und/oder rohem Rapsöl, mit einem Phosphatase-Enzym, vorzugsweise Phytase und/oder saure Phosphatase, und ggf. einer Phospholipase ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phospholipase A1, Phospholipase A2, Phospholipase B, Phospholipase C, Phospholipase D, oder Acyltransferase

b) Abtrennen der Schleimstoffe von dem Pflanzenöl durch Zentrifugation.

[0095] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vor Schritt a) des Verfahrens eine sogenannte Vorkonditionierung durchgeführt, indem das rohe Öl in einem eigenen Verfahrensschritt mit einer Menge von 300-1.000 ppm an organischer Säure, bevorzugt Zitronensäure, vermischt wird. Die Temperatur der Mischung wird hierbei bevorzugt auf 45 bis 85 °C eingestellt, besonders bevorzugt 48-80 °C. Nach einer Reaktionszeit von vorzugsweise 10 Minuten bis 2 Stunden, weiter bevorzugt 15 min - 1 Stunde, wird die Mischung durch Zugabe einer stöchiometrischen Menge Lauge, bevorzugt Natronlauge, in einer Menge von bevorzugt 0,5 bis 2 Mol/l, besonders bevorzugt 1 Mol/l, auf einen pH von 4-5 eingestellt. Erst danach wird gemäß Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens weiter verfahren.

Allgemeine Ausführungsform B)**[0096]**

a) in-Kontakt-Bringen der Triglyceride, vorzugsweise des rohen Sojaöls und/oder Rapsöls, mit einem Phosphatase-Enzym, vorzugsweise Phytase und/oder saure Phosphatase, und ggf. einer Phospholipase ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phospholipase A1, Phospholipase A2, Phospholipase B, Phospholipase C, Phospholipase D, oder Acyltransferase, wobei es bevorzugt ist, wenn mindestens ein Enzym auf einem Träger immobilisiert vorliegt; Hierbei ist es besonders bevorzugt, dass die Phosphatase-Enzyme und ggf. der Phospholipase-Enzyme in einer wässrigen Phase (Puffer bevorzugt im Bereich pH 4,0 bis 5,5 in einer Konzentration von 0,05 bis 5 % w/v eingesetzt werden.

Das in-Kontakt-Bringen erfolgt dabei bevorzugt bei einer Temperatur von 20 bis 70 °C, bevorzugter 40 bis 65 °C.

b) Abtrennen der Schleimstoffe von den Triglyceriden durch Zentrifugation.

[0097] Diese bevorzugte Ausführungsform B) wird in einer bevorzugten Ausführungsform mit einer Nachentschleimung durch die Zugabe von einer organischen Säure und/oder Lauge (nach Schritt b) bzw. b1)) kombiniert. Die Temperatur der Mischung wird hierbei bevorzugt auf 35 bis 60 °C eingestellt, besonders bevorzugt 50 °C. Nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten bis 2 Stunden, bevorzugt 1 Stunde, wird die Mischung durch Zugabe einer Lauge, bevorzugt Natronlauge, in einer Konzentration von bevorzugt 0,5 bis 2 Mol/l, besonders bevorzugt 1 Mol/l, auf einen pH von 4-5 eingestellt.

Allgemeine Ausführungsform C)

[0098] Gemäß der bevorzugten Ausführungsform C) wird anstelle des rohen Pflanzenöls eine Schleimphase, welche durch ein herkömmliches oder das erfindungsgemäße Entschleimungsverfahren abgetrennt wurde, mit dem bzw. den Enzymen in-Kontakt-gebracht.

[0099] Das Verfahren erfolgt bevorzugt gemäß der Ausführungsform A), B) oder D). Dieses Verfahren ermöglicht beispielsweise die Rückgewinnung von entschleimtem Öl, das mit der Schleimphase abgetrennt wurde. Es gestattet somit eine Rückgewinnung des Öls und führt zu einer indirekten Erhöhung der Ölausbeute; außerdem ermöglicht es eine Entölung des Lecithins.

Allgemeine Ausführungsform D)**[0100]**

a) in-Kontakt-Bringen der Triglyceride, vorzugsweise des rohen Sojaöls und/oder Rapsöls, mit einem Phosphatase-Enzym, vorzugsweise Phytase und/oder saure Phosphatase, und ggf. einer Phospholipase ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Phospholipase A1, Phospholipase A2, Phospholipase B, Phospholipase C, Phospholipase D, oder Acyltransferase, wobei es besonders bevorzugt ist, wenn mindestens ein Enzym auf einem Träger immobilisiert vorliegt.

Das in-Kontakt-Bringen erfolgt dabei bevorzugt bei einer Temperatur von 70 bis 100 °C, bevorzugter 75 bis 85 °C und erfolgt unter Verwendung ausschließlich thermostabiler Enzyme bzw. von Enzymen, deren Denaturierungstemperatur mindestens 1 °C, bevorzugt 5 °C oberhalb der Prozesstemperatur liegt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vor Schritt a) des Verfahrens eine sogenannte Vorkonditionierung durchgeführt, indem das rohe Öl in einem eigenen Verfahrensschritt mit einer Menge von 300-1.500 ppm an organischer Säure, bevorzugt Zitronensäure, vermischt wird. Die Temperatur der Mischung wird hierbei bevorzugt auf 40 bis 85 °C eingestellt, besonders bevorzugt 48-80 °C. Nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten bis 2 Stunden, bevorzugt 15 min - 1 Stunde wird die Mischung durch Zugabe einer Lauge, bevorzugt Natronlauge, in einer Menge von bevorzugt 0,5 bis 2 Mol/l, besonders bevorzugt 1 Mol/l auf bevorzugt pH 4-5, konditioniert. Erst danach wird gemäß Schritt a) des erfindungsgemäßen Verfahrens weiter verfahren.

b) Abtrennen der Schleimstoffe von den Triglyceriden durch Zentrifugation.

[0101] Zudem lassen sich etwaige, noch im Pflanzenöl gelöste und durch die Phospholipasen nicht gespaltene Phosphatidsäuren weiter reduzieren, indem der Ca- und/oder Mg-Gehalt des erfindungsgemäß behandelten Öls reduziert wird. Daher werden die oben angeführten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens A) bis D) in allgemeinen Ausführungsformen noch durch einen Folgeschritt ergänzt, bei dem durch nochmalige Zugabe von Komplexie-

rungsmitteln, wie z.B. Zitronensäure oder Phosphorsäure, der Gehalt an zweiwertigen Ionen und parallel dazu der Gehalt an P im Öl weiter reduziert wird.

[0102] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, den Phosphorwert in dem rohen Pflanzenöl stark abzusenken. Dabei wird der Phosphorwert auf unter 20 ppm gesenkt, besonders bevorzugt auf unter 10 ppm.

[0103] Weiterhin ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, den Calcium- und Magnesiumgehalt des rohen Pflanzenöls auf unter 20 ppm zu senken, besonders bevorzugt auf unter 15 ppm, ganz besonders bevorzugt auf unter 10 ppm, ebenfalls bevorzugt auf unter 8 ppm und am meisten bevorzugt auf unter 4 ppm. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird der Calcium- und Magnesiumgehalt auf unter 3 ppm gesenkt.

Beispiele und Figuren:

[0104] Die Erfindung wird im Weiteren an Hand von Figuren und Beispielen näher erläutert. Es wird hierbei betont, dass die Beispiele und Figuren lediglich veranschaulichenden Charakter besitzen und besonders bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung veranschaulichen. Weder Beispiele noch Figuren beschränken den Rahmen der vorliegenden Erfindung.

[0105] Es zeigen:

Fig. 1 Sojaöl: Vorkonditionierung mit 2 % Gesamtwasseranteil

Fig. 2 Sojaöl: Vorkonditionierung mit Zugabe von Enzym PLA1 0,3 Units/g Öl und 2 % Gesamtwasseranteil

Fig. 3 Sojaöl: Vorkonditionierung mit Zugabe von Enzym PLA1 0,3 Units/g Öl und dem Enzym Phytase 1 Unit/g Öl, 2 % Gesamtwasseranteil

Fig. 4 Rapsöl: Vorkonditionierung mit 3 % Gesamtwasseranteil

Fig. 5 Rapsöl: Vorkonditionierung mit Zugabe von Enzym PLA1 0,3 Units/g Öl und 3 % Gesamtwasseranteil

Fig. 6 Rapsöl: Vorkonditionierung mit Zugabe von Enzym PLA1 0,3 Units/g Öl und dem Enzym saurer Phosphatase 0,4 Unit/g Öl, 3 % Gesamtwasseranteil

Methoden

[0106] Es wurden folgende Analysenmethoden verwendet:

Bestimmung des Phosphorgehaltes in den Pflanzenölen

[0107] Die Bestimmung von Phosphor erfolgte durch ICP gemäß DEV E-22.

Bestimmung des Calcium- und Magnesiumgehaltes in den Pflanzenölen

[0108] Die Bestimmung von Calcium bzw. Magnesium erfolgte durch ICP gemäß DEV E-22.

Bestimmung des Gehalts freier Fettsäuren (FFA)

[0109] Bestimmt wird der Gehalt freier Fettsäuren über den Verbrauch an Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid über eine Verseifungsreaktion. Erhalten wird der prozentuale Gehalt freier Fettsäuren im untersuchten Öl. Die Bestimmung erfolgte gemäß DIN 53402 (Methode DGF C-V 2).

Bestimmung des Schleimvolumens

[0110] Mithilfe dieser Bestimmung wird die im Öl enthaltene Schleimphase von enzymatisch unbehandeltem und enzymatisch behandeltem Schleim gemessen. Ein 10 mL Schleuderglas wird auf die Arbeitstemperatur des Reaktionsansatzes erwärmt, die Proben (2 x 2 mL) werden eingefüllt und temperiert mindestens 4 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert um die Schleimphase vom Öl zu trennen. Von der oberen Ölphasen werden Proben für die Analytik entnommen. Zu Dokumentationszwecken wird das Ergebnis der Phasenbildung zusätzlich fotografiert.

Bestimmung der Ölausbeute, des Ölgehalts in der Schleimphase und des Schleimvolumens

[0111] Die Bestimmung der Ölausbeute, des (Rest-)Ölgehalts in der Schleimphase und des Schleimvolumens sind durch die Bestimmung des Schleimvolumens nach standardisiertem Verfahren, wie sie auch in PCT/EP 2013/053 199 beschrieben sind, detektierbar. Weiterhin kann durch Soxhlet-Extraktion des isolierten Schleims der Ölgehalt des Schleims separat gemäß DIN ISO 659 bestimmt werden.

Variante 1:

[0112] Die zu behandelnde Menge Rohöl, 400 bis 600 g, wird in einen Duran Reaktor DN120 1000 mL eingefüllt und Proben für die Analytik werden abgenommen. Das Öl im Duranreaktor wird mithilfe einer Heizplatte auf eine Temperatur von 35 bis 90 °C, insbesondere 48 °C oder 80°C, aufgeheizt, wobei eine Temperatur eingehalten werden muss, bei welcher das Enzym nicht denaturiert. Nachdem die Temperatur erreicht ist, wird mit der Vorkonditionierung begonnen. Dafür wird eine definierte, von der Ölmenge abhängige Menge verdünnter Zitronensäure (z. B. 450-1000 ppm), zum Öl zudosiert. Anschließend kann die Mischung mit einem Ultraturrax für 1 Minute durchmischt werden. Als Alternative wird unter Rühren bei etwa 600 rpm, 15 min bis 1 Stunde, inkubiert um die Reaktion der Säure abzuwarten. Anschließend wird eine definierte Menge Natronlauge (1-4 Mol/L, Restmenge zu 2-3 % v/v, abzüglich Wasser aus Säurezugabe und Enzymzugabe) zugegeben und es wird weitere 10 Minuten unter Rühren inkubiert. An dieser Stelle erfolgt die Zugabe des Enzyms, der Enzym-Mischung oder des Immobilisats, vorzugsweise gelöst in Puffer. Das Enzym wird untergerührt, wofür die Rührerdrehzahl kurzzeitig erhöht werden kann (1 Minute auf 900 rpm), anschließend wird bei niedrigerer Drehzahl weitergerührt.

[0113] Die Probenahme erfolgt in definierten Zeitabständen. Die Probe wird mithilfe einer Pipette genommen, in ein temperiertes Schleuderglas eingefüllt (Temperatur des Reaktionsansatzes) und temperiert mindestens 4 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert um die Schleimphase vom Öl zu trennen. Zu Dokumentationszwecken wird das Ergebnis der Phasenbildung fotografiert. Vom Überstand werden Proben zur Bestimmung des Phosphor-, Calcium- und Magnesiumgehaltes genommen.

Variante 2:

[0114] In einer weiteren Durchführung werden Phosphatasen und ggf. zusätzliche Enzyme in einer geeigneten Kombination als freie Enzyme oder immobilisierte Enzyme zusammen mit einer wässrigen Phase (Enzym-Puffer, pH 4-5) 0,05 bis 5 % w/v, dem Rohöl zugesetzt. Die Emulsion, bestehend aus Wasser, Enzym, eventuell Enzymträgern und Öl, wird durchmischt. Idealerweise wird die Reaktion temperiert zwischen 20 bis 70 °C, besser zwischen 40 bis 65 °C durchgeführt. Anschließend wird die Phasentrennung abgewartet, die Feststoffe setzen sich ab oder können nach einem dem Fachmann bekannten Standardverfahren z. B. über Zentrifugation oder Filtration entfernt werden. Als Nachbehandlung kann das Öl mit verdünnter Säure (z. B. Zitronensäure) oder Lauge nach einem dem Fachmann als Entschleimung bekannten Verfahren restentschleimt werden.

Variante 3:

[0115] In einer weiteren Durchführung wird Ölschleim mit Enzymen behandelt. Dem Ölschleim, welcher nach einem dem Fachmann als Entschleimung bekannten Verfahren erhalten wird, werden neben Phospholipasen, weitere Enzyme zugesetzt. Diese können sich gelöst in einer wässrigen Phase oder suspendiert in einem organischen Lösungsmittel befinden. Der Ansatz wird idealerweise auf eine Temperatur zwischen 20 bis 70 °C temperiert, besser auf eine Temperatur zwischen 35 bis 65 °C. Der Ansatz wird durchmischt bis der Prozess abgeschlossen ist. Dies kann durch Viskositätsmessungen überprüft werden oder visuell, durch Auflösen der ansonsten festen Schleimphase. Durch Zentrifugation lässt sich eine Phasenseparation erreichen, die einzelnen Phasen können abgetrennt werden. In der Regel besteht die obere Phase aus dem gewonnenen Öl, die mittlere Phase aus den Phospholipiden und die untere Phase ist eine wässrige Phase und enthält die Enzyme. Durch Wiederverwendung der wässrigen Phase lassen sich die Enzyme recyceln und wiederverwenden. Je nach Gehalt zweiwertiger Ionen muss das Öl oder die das Enzym enthaltende Wasserphase durch Zusatz von Komplexierungsmitteln vor der weiteren Verwendung von den Ionen gereinigt werden.

Variante 4:

[0116] In einer weiteren Durchführung wird das Rohöl auf eine hohe Temperatur gebracht, vornehmlich 70 bis 100 °C, genauer 75 bis 85 °C. Das Rohöl wird nach dem oben beschriebenen Verfahren mit Säure und Lauge konditioniert, die Temperatur wird beibehalten und es werden thermostabile Enzyme zusetzt. Im Weiteren wird wie bereits beschrieben fortgefahren. Das Enzym wird untergerührt, wofür die Rührerdrehzahl kurzzeitig erhöht werden kann (z. B. 1 Minute auf

900 rpm), anschließend wird bei 600 rpm weitergerührt, bis die Reaktion beendet ist. Die Abtrennung des Ölschleims kann wie vorhergehend beschrieben erfolgen.

Beispiel 1:

[0117] Gemäß Reaktionsvariante 1 wurde ein Sojaöl mit folgenden Ausgangsgehalten verwendet: Phosphor 700 ppm, Calcium 65,6 ppm, Magnesium 62,6 ppm und einem Gehalt an freien Fettsäuren von 1 %. Das Rohöl wurde einer Vorkonditionierung mithilfe von wässriger Zitronensäure (450 ppm) und wässriger Natronlauge (1 Mol/L) unterzogen. Es wurden regelmäßig Proben genommen (siehe Tabelle 1). Am Ende der Reaktion wurde die Schleimphase abzentrifugiert und der Restölgehalt dieser nach Soxhlet bestimmt.

[0118] Als Vergleich wurde eben diese Vorkonditionierung mit Zugabe eines Enzyms, Phospholipase A1 aus dem Organismus *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich), durchgeführt (siehe Figur 2, Tabelle 2). In Figur 3, Tabelle 3 sind Ergebnisse der Vorkonditionierung mit Zusatz des Enzyms PLA1 aus *Thermomyces lanuginosus* und eines weiteren Enzyms, einer Phytase, d.h. einer 6-Phytase aus *Aspergillus niger* (von ASA-Spezialenzyme), dargestellt.

Tab. 1 Vorkonditionierung mit 2 % Gesamtwasseranteil, Phosphor-, Calcium-, Magnesium- und FFA Gehalt

Zeit [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
Schleim [%]3 min	4,5	4,5	4,5	4, 0	4, 0

Tab. 2 Vorkonditionierung mit Zugabe von PLA1 aus *Thermomyces lanuginosus* 0,3 Units/g Öl und 2 % Gesamtwasseranteil, Phosphor-, Calcium-, Magnesium- und FFA Gehalt

Zeit [min]	10	60	120	180
Ca [ppm]	9,6	9,9	9,3	8,1
Mg [ppm]	4,4	3,2	3,6	3
P [ppm]	23	14	18	15
FFA [%]	0,79			1,24
Schleim [%]3 min	4,8	3,0	2, 8	2,5

Tab. 3 Vorkonditionierung mit Zugabe von PLA1 (aus *Thermomyces lanuginosus*) 0,3 Units/g Öl und Phytase 1 Unit/g Öl (6-Phytase), 2 % Gesamtwasseranteil, Phosphor, Calcium-, Magnesium- und FFA Gehalt

Zeit [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	4	6,1	5,5	4,7 7	-
Mg [ppm]	2, 9	2,3	2,1	1,7 7	-
P [ppm]	24	13	13	11	-
FFA [%]	0,77			1,28	1,37
Schleim [%]3 min	4,3	2, 8	2, 0	2, 0	1,8

[0119] Wie aus Figur 1 ersichtlich ist, führt die Anwendung von Säure und Lauge auf das Rohöl als Vorkonditionierung zu einem nicht unerheblichen Schleimvolumen, welches in der Folge trotz Einsatz eines Rührers bei 600 rpm nicht wesentlich abnimmt. Das einzelne Foto entspricht einer Probeentnahme. Die Probeentnahmen erfolgen zu den Zeitpunkten 10, 60, 120, 180 und 240 Minuten. In Tabelle 1 sind die zugehörigen analytischen Daten aufgeführt: der Phos-

phorgehalt sank nach 240 Minuten von 33 ppm auf 21 ppm; die Konzentration der zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium nimmt im Fall des Calciums von 7,8 ppm auf 9,8 ppm leicht zu; die Konzentration des Magnesiums sinkt von 4,1 ppm auf 3,2 ppm im Verlauf der Reaktion. Der Gehalt freier Fettsäuren bleibt nahezu unverändert. Die Vorkonditionierung dient als Vorbereitungsreaktion zur Ölentseimung und gleichzeitig als Referenzbehandlung.

[0120] In Figur 2 ist bei Verwendung des Enzyms Phospholipase A1 aus *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich) eine Abnahme des Schleimvolumens im Verlauf der Reaktion erkennbar (je Messung/Probenahme ein Foto). Die zugehörigen Daten und die Zeitpunkte der Probenahme sind in Tabelle 2 dargestellt. Aus Tab. 2 ergibt sich eine Abnahme der Calciumkonzentration von 9,6 ppm auf 8,1 ppm, eine Abnahme der Magnesiumkonzentration von 4,4 ppm auf 3 ppm und eine Abnahme des Phosphorgehalts von 23 ppm auf 15 ppm; der Gehalt freier Fettsäuren steigt von 0,79 % auf 1,24 % an, jeweils nach 180 min Reaktionszeit. Aus dem Anstieg im Gehalt der freien Fettsäuren und der Abnahme des Phosphorgehalts lässt sich schließen, dass die PLA1 enzymatisch aktiv ist und folglich die Ölentseimung erfolgreich funktioniert. Die Zunahme der freien Fettsäure ist ein Zeichen für die Aktivität der PLA1, welche die Fettsäuren aus den Phospholipidmolekülen abspaltet und auch das Schleimvolumen nimmt kontinuierlich ab.

[0121] In Figur 3 ist das Volumen der Schleimphase eines mit PLA1 und zusätzlich mit Phytase, d.h. einer 6-Phytase aus *Aspergillus niger* (ASA Spezialenzyme), behandelten vorkonditionierten Rohöls dargestellt. Aus den dazugehörigen analytischen Daten aus Tabelle 3 ist ersichtlich, dass erstaunlicherweise bereits nach 120 Minuten ein reduziertes Schleimvolumen von 2,0 % erreicht wird, im Vergleich zum Schleimvolumen von 2,8 % bei Einsatz der PLA1 alleine (Tabelle 2). Zusätzlich sind die Ionenwerte (Tabelle 3) im Vergleich zu den Werten in Tabelle 2 schneller verringert auf 4,7 ppm Ca, 1,7 ppm Mg und 11 ppm P z. B. nach 180 min Reaktion. Zusätzlich steigt der Gehalt freier Fettsäuren von 0,77 % auf 1,28 % an und weist damit auf die Aktivität der Phospholipase hin. Die Ergebnisse belegen, dass es erstaunlicherweise durch Zusatz eines einzigen weiteren Enzyms, einer Phytase, zu einer schnelleren und stärkeren Reduktion der Schleimphase kommt.

Beispiel 2:

[0122] Gemäß Reaktionsvariante 1 wurde ein Rapsöl mit folgenden Ausgangsgehalten verwendet: Phosphor 1200 ppm, Calcium 365 ppm, Magnesium 145 ppm und einem Gehalt an freien Fettsäuren von 1,65 %. Das Rohöl wurde einer Vorkonditionierung mithilfe von wässriger Zitronensäure (1000 ppm) und wässriger Natronlauge (4 Mol/L) unterzogen. Es wurden regelmäßig Proben genommen (siehe Tabelle 4). Am Ende der Reaktion wurde die Schleimphase abzentrifugiert und der Restölgehalt dieser nach Soxhlet bestimmt.

[0123] Als Vergleich wurde eben diese Vorkonditionierung mit Zugabe eines Enzyms, Phospholipase A1 aus dem Organismus *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich), durchgeführt (siehe Figur 5, Tabelle 5). In Figur 6, Tabelle 6 sind Ergebnisse der Vorkonditionierung mit Zusatz des Enzyms PLA1 (aus *Thermomyces lanuginosus*) und eines weiteren Enzyms, einer sauren Phosphatase aus Süßkartoffel (Sigma-Aldrich), dargestellt.

Tab. 4 Vorkonditionierung mit 3 % Gesamtwasseranteil, Phosphor-, Calcium-, Magnesium- und FFA Gehalt

Zeit [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
Schleim [%]3 min	5,8	6,5	6,0	6,0	5,8

Tab. 5 Vorkonditionierung mit Zugabe von PLA1 aus *Thermomyces lanuginosus* 0,3 Units/g Öl und 3 % Gesamtwasseranteil, Phosphor-, Calcium-, Magnesium- und FFA Gehalt

Zeit [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

EP 2 799 531 A1

(fortgesetzt)

Zeit [min]	10	60	120	180	240
Schleim [%]3 min	6,5	5,6	5,0	4,5	5,5

Tab. 6 Vorkonditionierung mit Zugabe von PLA1 0,3 Units/g Öl und saurer Phosphatase 0,407 Unit/g Öl, 3 % Gesamtwasseranteil, Phosphor, Calcium-, Magnesium- und FFA Gehalt

Zeit [min]	10	60	120	180	240
Ca [ppm]	15	13	9,7	9,6	8,2
Mg [ppm]	5,2	3,5	1,8	1,9	1,6
P [ppm]	39	25	13	14	11
FFA [%]	1,73			2,14	2,28
Schleim [%]3 min	7,2	5,0	4,6	4,0	4,1

[0124] Wie aus Figur 4 ersichtlich ist, führt die Anwendung von Säure und Lauge auf das Rohöl als Vorkonditionierung zu einem nicht unerheblichen Schleimvolumen, welches in der Folge trotz Einsatz eines Rührers bei 600 rpm nicht wesentlich abnimmt. Das einzelne Foto entspricht einer Probeentnahme; die Probeentnahmen erfolgen zu den Zeitpunkten 10, 60, 120, 180 und 240 Minuten. In Tabelle 4 sind die zugehörigen analytischen Daten aufgeführt, der Phosphorgehalt sank nach 240 Minuten von 247 ppm auf 14 ppm, die Konzentration der zweiwertigen Ionen Calcium und Magnesium nimmt im Fall des Calciums von 76 ppm auf 9,5 ppm ab, die Konzentration des Magnesiums sinkt von 31 ppm auf 1,7 ppm im Verlauf der Reaktion. Der Gehalt freier Fettsäuren bleibt nahezu unverändert. Die Vorkonditionierung dient als Vorbereitungsreaktion zur Ölentseimung und gleichzeitig als Referenzbehandlung.

[0125] In Figur 5 ist bei Verwendung des Enzyms Phospholipase A1 aus *Thermomyces lanuginosus* (Sigma-Aldrich) eine Abnahme des Schleimvolumens von 1 % im Verlauf der Reaktion erkennbar (je Messung/ Probenahme ein Foto). Die zugehörigen Daten und die Zeitpunkte der Probenahme sind in Tabelle 5 dargestellt. Aus Tab. 5 ergibt sich eine Abnahme der Calciumkonzentration von 26 ppm auf 7,9 ppm, eine Abnahme der Magnesiumkonzentration von 9,7 ppm auf 1,5 ppm und eine Abnahme des Phosphorgehalts von 82 ppm auf 12 ppm, der Gehalt freier Fettsäuren steigt von 1,76 % auf 2,14 % an. Die Zunahme der freien Fettsäure ist ein Zeichen für die Aktivität der PLA1, welche die Fettsäuren aus den Phospholipidmolekülen abspaltet, und auch das Schleimvolumen nimmt ab.

[0126] In Figur 6 ist das Volumen der Schleimphase eines mit PLA1 (aus *Thermomyces lanuginosus*) und zusätzlich mit saurer Phosphatase aus Süßkartoffel behandelten vorkonditionierten Rohöls dargestellt. Aus den dazugehörigen analytischen Daten aus Tabelle 6 ist ersichtlich, dass erstaunlicherweise durch den zusätzlichen Einsatz der sauren Phosphatase im Vergleich zum alleinigen Einsatz der Phospholipase (Abb. 5, Tab.5) das Schleimvolumen der Reaktion deutlich verringert wird. Dies ist gleichbedeutend mit einer Steigerung der Ölausbeute (vergleiche Abb. 5 und 6, Tabelle 5 + 6) und damit einer größeren Gewinnspanne des Prozesses.

Tabelle 7: Sojaöl: Gesamtölausbeute der Reaktionen aus Beispiel 1 nach Soxhlet-Extraktion der Schleimphase

Mittel	Ölausbeute [%]
H3Cit (Zitronensäure)	97,1
PLA1 (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	97,4
6-Phytase (<i>Aspergillus niger</i>)	97,3
6-Phytase (<i>Aspergillus niger</i>) + PLA1 (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	97,7

Tabelle 8: Rapsöl: Gesamtölausbeute der Reaktionen aus Beispiel 2 nach Soxhlet-Extraktion der Schleimphase

Mittel	Ölausbeute [%]
H3Cit (Zitronensäure)	96,2

(fortgesetzt)

Mittel	Ölausbeute [%]
PLA1 (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	97,4
Saure Phosphatase (Süßkartoffel)	96,7
Saure Phosphatase (Süßkartoffel) + PLA1 (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	98,3

[0127] In Tabellen 7 und 8 sind die Gesamtölausbeuten der Reaktionen aus den Beispielen 1 und 2 nach Soxhlet-Extraktion der Schleimphase dargestellt. Hierbei ist ersichtlich, dass die eingesetzten Phosphatasen alleine und in Kombination mit der PLA1 die Ölausbeuten deutlich steigern.

[0128] Es werden pro Jahr weltweit ca. 43,5 Mio Tonnen Sojaöl hergestellt (USDA FAS - 2012). Bei einer Ölausbeuteerhöhung von 97,1% beim Standardprozess auf 97,7% durch den enzymatischen Prozess Phytase und PLA1 würden 260.000 Tonnen mehr Sojaöl pro Jahr hergestellt werden können.

[0129] Es werden pro Jahr weltweit ca. 23,5 Mio Tonnen Rapsöl hergestellt (USDA FAS - 2012). Bei einer Ölausbeuteerhöhung von 96,2% beim Standardprozess auf 98,3% durch den enzymatischen Prozess saure Phosphatase aus Süßkartoffel und PLA1 würden 500.000 Tonnen mehr Rapsöl pro Jahr hergestellt werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur enzymatischen Entschleimung von Triglyceriden oder zur Verringerung des Ölgehalts im Pflanzenölschleim, der bei der Ölent Schleimung anfällt, welches Verfahren folgende Schritte umfasst:

a) In Kontakt-Bringen der Triglyceride oder des Pflanzenölschleims, der bei der Ölent Schleimung anfällt, mit einer Zusammensetzung, die mindestens eine Phosphatase enthält; und

b1) im Fall von Triglyceriden als Ausgangsmaterial: Abtrennen der Schleimstoffe von den Triglyceriden; oder

b2) im Fall von Pflanzenölschleim als Ausgangsmaterial: Auftrennung in eine wässrige, Lecithin-enhaltende Phase und eine Öl-haltige Phase.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die mindestens eine Phosphatase eine saure Phosphatase oder eine Phytase oder eine Kombination aus beiden Enzymen darstellt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die saure Phosphatase ein Enzym der Klasse EC 3.1.3.2 ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei die saure Phosphatase aus Pflanzen, oder aus Säugetiermilch oder aus einem Pilz, Hefe oder Bakterium stammt.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Phytase ausgewählt ist aus der Gruppe von 3-Phytase (EC 3.1.3.8), 4-Phytase (EC 3.1.3.26), 5-Phytase (EC 3.1.3.72), 6-Phytase (EC 3.1.3.26) oder Gemischen von zwei oder mehreren Phytasen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei zusätzlich ein Phospholipid-spaltendes Enzym eingesetzt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei das Phospholipid-spaltende Enzym aus der Phospholipase A1, Phospholipase A2, Phospholipase B, Phospholipase C, Phospholipase D oder Acyltransferase ausgewählt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, wobei die enzymatischen Umsetzungen mit einer Phytase bei einem pH Wert des wässrigen Teil der Öl-Wasser-Mischung durchgeführt werden, der kleiner oder gleich 8 ist, bzw., die enzymatischen Umsetzungen mit einer sauren Phosphatase bei einem pH Wert des wässrigen Teil der Öl-Wasser-Mischung durchgeführt werden, der kleiner oder gleich 7 ist.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Phosphatase und/oder das Phospholipid-spaltende Enzym in geträgerter Form vorliegen.

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Sojaöl, Rapsöl, Canolaöl, Sonnenblumenöl, Olivenöl, Palmöl, Jatrophaöl, Leindotteröl oder Baumwollsaatöl als Öle eingesetzt werden.

EP 2 799 531 A1

11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei anstelle des Pflanzenöls ein wässriger Pflanzenölschleim, der bei der Ölentseimung von einem der Öle nach Anspruch 10 anfällt, eingesetzt wird.
12. Verwendung eines der Enzyme, wie in einem der Ansprüche 1 bis 9 definiert, zur Erhöhung der Ölausbeute bei der Ausführung einer wässrigen Öl-Entseimung.
13. Verwendung nach Anspruch 12 zur Entölung von Pflanzenölschleim.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1

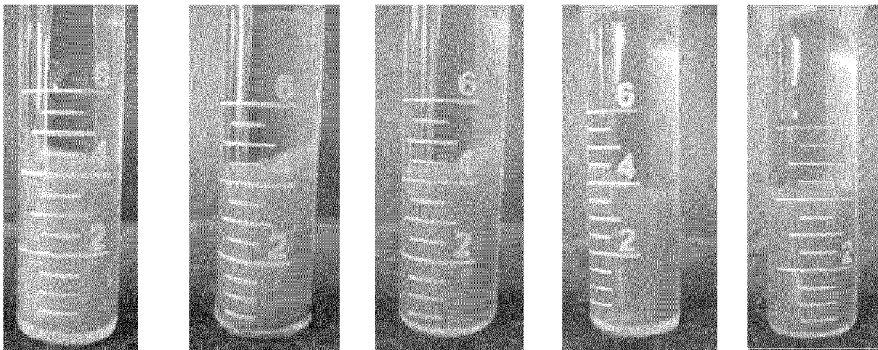


Fig. 2

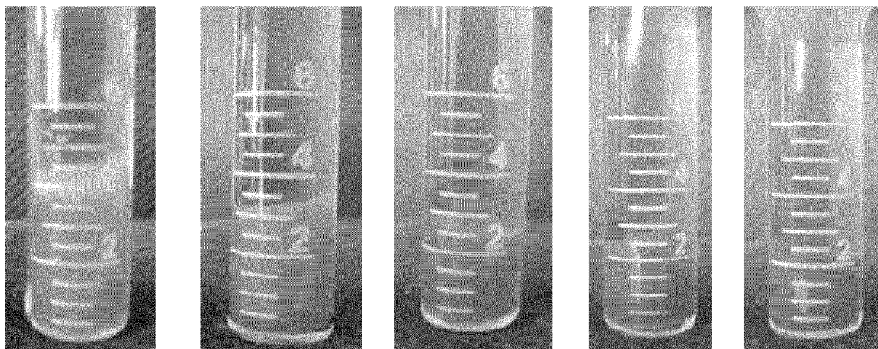


Fig. 3

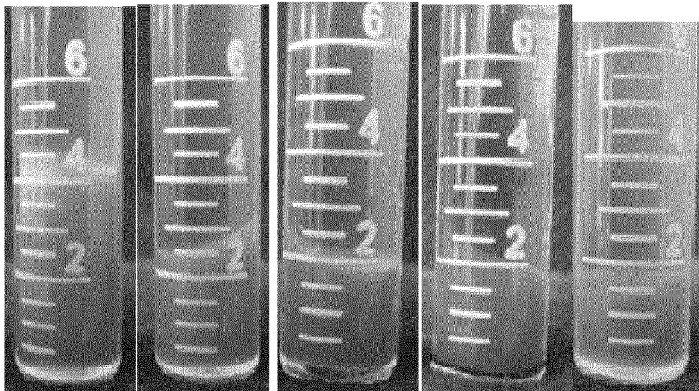


Fig. 4

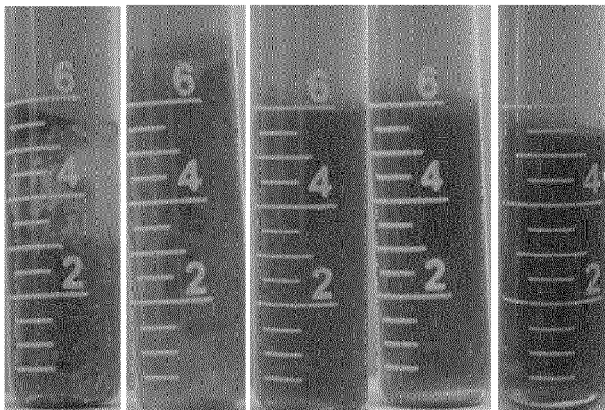


Fig. 5

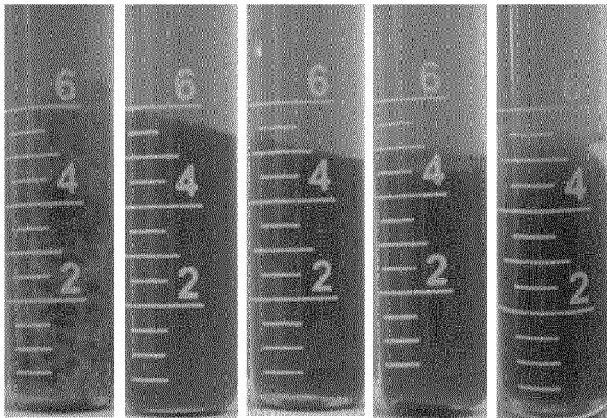
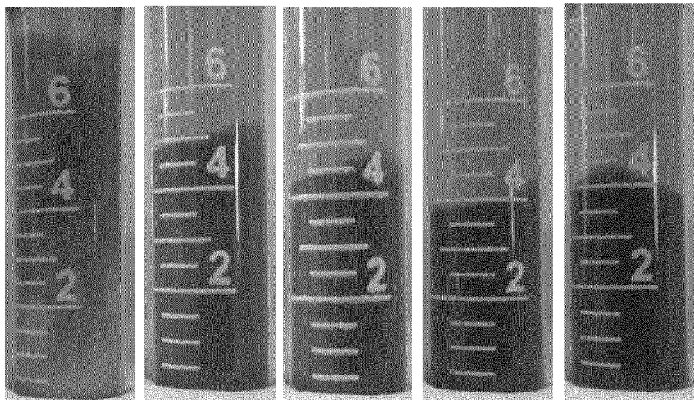


Fig. 6





EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

 Nummer der Anmeldung
EP 13 16 6529

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (IPC)
X	US 2013/011887 A1 (DAYTON CHRISTOPHER L G [US] ET AL) 10. Januar 2013 (2013-01-10) * Absätze [0010], [0429], [0585] * -----	1-4,6,7, 9-13	INV. C11B3/00 C11B3/04 C11B3/16
X	US 2010/136113 A1 (STEER BRIAN [US] ET AL) 3. Juni 2010 (2010-06-03) * Absatz [0048] * -----	1,2,5, 8-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (IPC)
			C11B
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort Den Haag		Abschlußdatum der Recherche 13. September 2013	Prüfer Kappen, Sascha
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	

EPO FORM 1503 03.82 (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 13 16 6529

5

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

13-09-2013

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2013011887 A1	10-01-2013	AR 078582 A1	16-11-2011
		CA 2774660 A1	21-04-2011
		CN 102575243 A	11-07-2012
		EP 2488639 A1	22-08-2012
		US 2013011887 A1	10-01-2013
		WO 2011046815 A1	21-04-2011

US 2010136113 A1	03-06-2010	AU 2007299612 A1	27-03-2008
		CA 2663819 A1	27-03-2008
		CN 101541822 A	23-09-2009
		EP 2057178 A2	13-05-2009
		EP 2397486 A1	21-12-2011
		EP 2617728 A2	24-07-2013
		EP 2617729 A2	24-07-2013
		EP 2617814 A2	24-07-2013
		EP 2617815 A2	24-07-2013
		EP 2617816 A2	24-07-2013
		EP 2617817 A2	24-07-2013
		EP 2617818 A2	24-07-2013
		EP 2617819 A2	24-07-2013
		EP 2617820 A2	24-07-2013
		EP 2617821 A2	24-07-2013
		EP 2617822 A2	24-07-2013
		EP 2617823 A2	24-07-2013
		EP 2620495 A2	31-07-2013
		JP 2010539888 A	24-12-2010
		NZ 575633 A	24-02-2012
		US 2010136113 A1	03-06-2010
		WO 2008036916 A2	27-03-2008

EPO FORM P0461

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- WO 08094847 A [0020] [0021]
- EP 0513709 B1 [0023]
- WO 2006008508 A [0024]
- WO 2009081094 A [0024]
- EP 1066373 B1 [0025]
- EP 2295553 A [0025]
- US 6475762 B [0025]
- WO 9855599 A [0025]
- WO 9949740 A [0025]
- WO 2004071218 A [0025] [0027]
- WO 2011117396 A [0025]
- US 2009081331 A [0025]
- WO 2009129489 A [0025]
- US 2004058049 A [0027]
- US 2004058049 A1 [0027]
- EP 1531182 A2 [0069]
- EP 2013053 W [0111]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **MICHAEL BOKISCH.** Fats and Oils Handbook. AOCS Press, 1998, 428-444 [0008]
- **NIELSEN, K.** Composition of difficultly extractable soy bean phosphatides. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 1960, vol. 37, 217-219 [0019]
- **A.J. DIJKSTRA.** Enzymatic degumming. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2010, vol. 112, 1178-1189 [0019] [0023]
- **CLAUSEN.** Enzymatic oil-degumming by novel microbial phospholipase. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2001, vol. 103, 333-340 [0023]
- **A.J. DIJKSTRA.** Recent developments in edible oil processing. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2009, vol. 111, 857-864 [0023]
- **KUSUDO T ; SAKAKI T ; INOUE K.** Purification and Characterization of Purple Acid Phosphatase PAP1 from Dry Powder of Sweet Potato. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2003, vol. 67 (7), 1609-11 [0036]
- **Enzymes in Industry.** Wiley VCH, 2004, 216 [0038]