

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 164**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C12P 21/00	(2006.01)
A23D 9/02	(2006.01)
A23J 1/14	(2006.01)
C07K 1/14	(2006.01)
C11B 1/02	(2006.01)
C13K 1/02	(2006.01)
C13K 13/00	(2006.01)
C13B 20/00	(2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2010 PCT/EP2010/065447**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11045387**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 10763726 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2488654**

54 Título: **Procedimiento de extracción enzimática en medio acuoso de aceite y proteínas a partir de material vegetal**

30 Prioridad:

16.10.2009 FR 0957274

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.07.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE (100.0%)
34 Cours Léopold, CS 25233
54052 Nancy Cedex, FR**

72 Inventor/es:

**MUNIGLIA, LIONEL;
GIRARDIN, MICHEL;
PIFFAUT, BERNADETTE y
RICOCHON, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 622 164 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 de extracción enzimática en medio acuoso de aceite y proteínas a partir de material vegetal

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con un procedimiento de extracción enzimática en medio acuoso de aceites, proteínas, y azúcares fermentables a partir de material vegetal.

Estado de la técnica

10 Los procedimientos tradicionales de extracción de aceites hacen intervenir solventes orgánicos, como el hexano. La utilización de estos solventes implican numerosos problemas de seguridad de las instalaciones y de las personas, la salud humana y la preservación del ambiente. Se busca en efecto reducir las emisiones de compuestos orgánicos volátiles (COV).

15 Desde hace una treintena de años, diversos equipos de investigación en el mundo trabajan para la puesta a punto de procedimientos "limpios" para la extracción de granos de oleaginosas. Estos procedimientos están fundamentados en una extracción de aceites por vía acuosa que asocian enzimas y catalizadores biológicos. Estos procedimientos, aunque se pretendan ecológicos, prevén utilizar a pesar de todo un solvente o prevén una etapa de corrección del pH mediante compuestos alcalinos o ácidos. Estos procedimientos no han sido validados a escala industrial pues los catalizadores utilizados no permiten buenos rendimientos a una escala tal. El documento WO01/60182 describe un procedimiento para separar los constituyentes de una biomasa que comprende una digestión enzimática en fase acuosa, en la cual se utiliza una mezcla de enzimas pectinasas, celulasas y hemicelulasas.

20 La presente invención tiene por objeto proponer un nuevo procedimiento de extracción de aceites a partir de un material vegetal, exento de los inconvenientes enumerados anteriormente. Más particularmente, la presente invención tiene por objeto proponer un procedimiento de extracción de aceites vegetales que permita suprimir el empleo de todos los solventes orgánicos y obtener un procedimiento limpio que permita extraer aceites, proteínas y otros coproductos de altas cualidades nutricionales.

25 La presente invención tiene igualmente por objeto proponer un procedimiento que pueda ser utilizado a nivel industrial con rendimientos interesantes.

La presente invención tiene igualmente por objeto proponer un procedimiento que permita utilizar todos los productos extraídos provenientes del procedimiento.

Divulgación de la invención.

30 Para este fin, la presente invención se relaciona con un procedimiento de extracción enzimática en medio acuoso de aceites, proteínas y azúcares fermentables a partir de material vegetal, que comprende las siguientes etapas:

a) adición de agua al material vegetal que presenta un tamaño de partícula apropiado,

35 b) adición de una mezcla enzimática que contiene al menos una celulasa, al menos una hemicelulasa y al menos una peptinasa, estando comprendida la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la celulasa entre 0.3 y 2.5, y más preferiblemente entre 0.35 y 0.45, y estando la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la hemicelulasa entre $1 \cdot 10^{-2}$ y 0.5, y más preferiblemente entre $1 \cdot 10^{-2}$ y $2 \cdot 10^{-2}$, siendo la actividad de la peptinasa inferior a 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, y preferiblemente inferior a 100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, en la cual la cantidad de la mezcla enzimática está comprendida entre 0.25% y 10% en volumen de la mezcla agua/material vegetal, preferiblemente entre 1% y 6%,

40 c) incubación bajo agitación del material vegetal y de la mezcla enzimática para liberar en el medio de reacción aceites, proteínas y azúcares fermentables, durante una duración que depende de los rendimientos buscados,

d) separación del medio de reacción para obtener aceite libre, una fase acuosa que contiene proteínas y azúcares fermentables, y una fase sólida,

45 e) eventualmente separación de una emulsión de aceite libre o de la fase acuosa, y reciclaje de la emulsión en el medio de reacción,

f) separación de proteínas y de azúcares fermentables de la fase acuosa.

La presente invención se relaciona igualmente con la utilización, en un procedimiento tal como se define anteriormente, de una mezcla enzimática tal como se define anteriormente, para suprimir cualquier etapa de corrección del pH en el dicho procedimiento.

50 Modos de realización de la invención

Según la invención, el procedimiento de extracción enzimática en medio acuoso de aceites, proteínas y azúcares fermentables, a partir de material vegetal, comprende las siguientes etapas:

- a) adición de agua al material vegetal que presenta un tamaño de partícula apropiado,
- 5 b) adición de una mezcla enzimática que contiene al menos una celulasa, al menos una hemicelulasa y al menos una peptinasa, estando comprendida la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la celulasa entre 0.3 y 2.5, y estando comprendida la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la hemicelulasa entre $1 \cdot 10^{-2}$ y 0.5, no siendo la actividad de la peptinasa nula e inferior a $120 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, en la cual la cantidad de la mezcla enzimática está comprendida entre 0.25% y 10% en volumen de la mezcla agua/material vegetal, preferiblemente entre 1% y 6%,
- 10 c) incubación bajo agitación del material vegetal y de la mezcla enzimática para liberar en el medio de reacción aceites, proteínas y azúcares fermentables, durante una duración que depende de los rendimientos buscados,
- d) separación del medio de reacción para obtener aceite libre, una fase acuosa que contiene proteínas y azúcares fermentables, y una fase sólida,
- 15 e) eventualmente separación de una emulsión de aceite libre o de la fase acuosa, y reciclaje de la emulsión en el medio de reacción,
- f) separación de las proteínas y/o de los azúcares fermentables de la fase acuosa en función de los productos que se desea recuperar.

En lo que se relaciona con la etapa a), el tamaño de partícula apropiado del material vegetal se obtiene ventajosamente por molienda del dicho material vegetal. La molienda debe ser lo más fina posible para favorecer la acción de las enzimas. Idealmente, todas las partículas deben de tener un tamaño cercano a $50 \mu\text{m}$, preferiblemente cercano a $10 \mu\text{m}$.

Ventajosamente, el volumen de agua es minimizado de manera que se reduzcan los efluentes que se van a tratar y concentrar los productos extraídos. Preferiblemente, la masa de agua añadida al material vegetal es igual a una o dos veces la masa del dicho material vegetal y no sobrepasa esta cantidad.

25 Preferiblemente, el procedimiento según la invención comprende además, después de la etapa a), una etapa de desactivación de las enzimas endógenas de la mezcla agua/material vegetal. Esta desactivación se hace preferiblemente mediante calor. La mezcla agua/material vegetal es calentada a una temperatura comprendida entre 80°C y 105°C durante 5 a 20 minutos. La temperatura es llevada a continuación a la temperatura utilizada para la etapa b).

30 En lo que se relaciona con la etapa b) la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la celulasa está comprendida entre 0.3 y 2.5, y más preferiblemente entre 0.35 y 0.45, y la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la hemicelulasa está comprendida entre $1 \cdot 10^{-2}$ y 0.5, y más preferiblemente entre $1 \cdot 10^{-2}$ y $2 \cdot 10^{-2}$, siendo la actividad de la peptinasa preferiblemente inferior a $100 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

35 Más particularmente, la mezcla enzimática utilizada contiene las actividades enzimáticas en las proporciones siguientes:

- celulasas:
- betaglucosidasa: entre $1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $30 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $4.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $13 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- endocelulasa: entre $20 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $200 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $27 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $120 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- exocelulasa: entre 0 y $50 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $9 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $25.5 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 40 - hemicelulasas:
- arabinasa : entre $300 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $2000 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $465 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $1335 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- xilanasa: entre 0 y $2000 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $300 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $1700 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- galactanasa: entre $300 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $2000 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $750 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $1000 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 45 - peptinasas:
- endopoligalacturonasa: entre $40 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $120 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $61 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $86 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- pectina metilestearasa: entre $1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y $20 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre $1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 5

µmol/min/ml.

Estas enzimas están disponibles en el comercio.

En el caso particular en donde el material vegetal es colza, la mezcla enzimática utilizada puede contener las actividades enzimáticas en las siguientes proporciones:

- 5
- celulasas:
 - betaglucosidasa: entre 3 µmol/min/ml y 6 µmol/min/ml,
 - endocelulasa: entre 110 µmol/min/ml y 130 µmol/min/ml,
 - exocelulasa: entre 20 µmol/min/ml y 30 µmol/min/ml,
 - hemicelulasas:
- 10
- arabinasa: entre 1200 µmol/min/ml y 1500 µmol/min/ml,
 - xilanasa: entre 1500 µmol/min/ml y 2000 µmol/min/ml,
 - galactanasa: entre 800 µmol/min/ml y 1200 µmol/min/ml,
 - pectinasas:
 - endopoligalacturonasa: entre 50 µmol/min/ml y 70 µmol/min/ml,
- 15
- pectina metilestearasa: entre 1 µmol/min/ml y 20 µmol/min/ml,

En el caso particular en donde el material vegetal es girasol, la mezcla enzimática utilizada puede contener las actividades enzimáticas en las siguientes proporciones:

- celulasas:
 - betaglucosidasa: entre 11 µmol/min/ml y 14 µmol/min/ml,
- 20
- endocelulasa: entre 25 µmol/min/ml y 35 µmol/min/ml,
 - exocelulasa: entre 8 µmol/min/ml y 12 µmol/min/ml,
 - hemicelulasas:
 - arabinasa: entre 450 µmol/min/ml y 550 µmol/min/ml,
 - xilanasa: entre 0 y 300 µmol/min/ml,
- 25
- galactanasa: entre 700 µmol/min/ml y 900 µmol/min/ml,
 - pectinasas:
 - endopoligalacturonasa: entre 75 µmol/min/ml y 95 µmol/min/ml,
 - pectina metilestearasa: entre 1 µmol/min/ml y 5 µmol/min/ml,

- 30
- La cantidad utilizada de mezcla enzimática tal como se define anteriormente está comprendida entre 0.25% y 10%, preferiblemente entre 1% y 6%, en volumen de la mezcla agua/material vegetal.

Además, la mezcla enzimática puede comprender igualmente una fenolato estearasa, preferiblemente una ferulato estearasa, cuya actividad está comprendida entre 1 µmol/min/ml y 15 µmol/min/ml, preferiblemente comprendida entre 4 µmol/min/ml y 15 µmol/min/ml, y preferiblemente comprendida entre 7.5 µmol/min/ml y 15 µmol/min/ml en el caso particular de la colza y entre 4 µmol/min/ml y 6 µmol/min/ml en el caso particular del girasol.

- 35
- Ventajosamente, la incubación según la etapa c) se realiza durante 2 a 20 horas, preferiblemente entre 4 y 12 horas, a una temperatura comprendida entre 25°C y 75°C, preferiblemente entre 40°C y 60°C, y preferiblemente alrededor de 50°C.

De una manera ventajosa, no está prevista ninguna etapa de corrección del pH, en particular cuando el material vegetal tratado es colza o girasol.

- 40
- El pH del medio de reacción debe estar comprendido entre 5.5 y 4.5, y preferiblemente comprendido entre 4.8 y 5.

Sin embargo, puede ser necesario en ciertos casos corregir el pH para corresponder al pH óptimo de las enzimas.

En este caso, se pueden utilizar ácidos tales como ácido acético (E 260) o ácido cítrico (E 330).

La agitación prevista en la etapa c) se realiza preferiblemente por medio de un mezclador que comprende aspas planas que favorecen la mezcla y limitan el cizallamiento. La agitación debe ser suficiente para asegurar la transferencia de calor pero minimizada para evitar la aparición de emulsión.

5 La duración de la incubación es adaptada en función de la cantidad de los productos extraídos deseados. En efecto, el tiempo de hidrólisis va a depender de la liberación en aceites, azúcares y en proteínas. La mayoría de las proteínas se solubiliza muy rápidamente, por ejemplo, en menos de una hora. El rendimiento en aceites se estabiliza entre 4 y 6 horas, luego continúa avanzando más lentamente. Las concentraciones en azúcares fermentables aumentan regularmente hasta 12 horas, y más allá.

10 La reacción de hidrólisis es detenida a continuación por desactivación de las enzimas por calentamiento preferiblemente entre 80°C y 105°C durante por ejemplo 5 a 20 minutos.

Luego el medio de reacción es separado, según la etapa d), utilizando todas las técnicas de separación conocidas adaptadas, tales como centrifugación o decantación. Idealmente esta separación se efectúa bajo 3000 g durante 5 minutos a 80°C.

15 De una manera ventajosa, la separación de los productos extraídos se realiza por medio de un Tricanter. Un tal aparato es un decantador centrífugo horizontal para la separación continua del medio de reacción en tres fases: el aceite libre, una fase acuosa que contiene una parte de las proteínas y de los azúcares fermentables, y una fase sólida constituida por tortas parcialmente desengrasadas. El Tricanter permite el reciclaje de los materiales y la gestión del tiempo de hidrólisis diferentes en función de los productos que se desea recuperar.

20 En función del material vegetal del cual se quiere extraer los aceites, la emulsión puede formarse en la fase oleosa o en la fase acuosa.

La mezcla enzimática utilizada en la invención permite limitar la cantidad de emulsión, en particular para el girasol.

25 Cuando se forma la emulsión, esta es separada de la fase con la cual ha sido recogida por ejemplo por medio de un decantador. La emulsión puede ser reciclada y reinyectada en el Tricanter con el fin de sufrir una nueva hidrólisis para liberar los aceites que contiene.

En la Tabla 1 más abajo se indican las cantidades de productos obtenidos a partir de 10 kg de granos (a 50% de aceite) mezclados con 10 kg de agua, tratados según el procedimiento de la invención:

Tabla I

Productos	Cantidad a partir de 10 kg de granos y 10 kg de agua
Aceite	4 a 4.7 kg
Fase acuosa y emulsión	11 a 15 kg
De los cuales azúcares	60 a 100 g/l de fase acuosa
De los cuales proteínas	25 a 35 g/l de fase acuosa
Tortas (lo restante de los granos)	2 - 4 kg

30 El aceite libre recuperado es almacenado inmediatamente bajo un gas inerte, tal como nitrógeno, esperando su refinación si es necesario. Contiene una gran proporción de tocoferoles. Estos antioxidantes buscados son arrastrados normalmente durante la etapa de desodorización. Su presencia en gran número de los aceites extraídos según el procedimiento de la invención, hace que sean en parte preservados durante la etapa de desodorización.

35 Las tortas son secadas y almacenadas o recicladas para sufrir una segunda hidrólisis. Pueden ser utilizadas para alimentación animal.

Los azúcares fermentables y las proteínas contenidas en la fase acuosa son separados por cualquier medio que lo permita, particularmente por técnicas de filtración (nanoultrafiltración), o por técnicas de precipitación.

40 Los azúcares fermentables de la fase acuosa sufren una fermentación por microorganismos (bacterias, levaduras, hongos) adaptados tales como *Saccharomyces cerevisiae*, para producir etanol, que se puede utilizar como biocombustible.

Las proteínas son extraídas de manera importante, siendo los rendimientos de extracción aproximadamente 10 veces superiores a los procedimientos tradicionales de extracción. Las proteínas son de muy buena calidad, muy

poco desnaturalizadas.

Así, todos los productos extraídos pueden adquirir valor.

Preferiblemente, el procedimiento según la invención es empleado con material biológico escogido entre el grupo que comprende las tortas grasas provenientes de la primera presión y los granos de oleaginosas.

- 5 Las oleaginosas se seleccionan preferiblemente entre el grupo que comprende la colza y el girasol. El procedimiento según la invención puede también ser aplicado a frutos oleaginosos, tales como las olivas.

Los ejemplos siguientes ilustran la presente invención pero sin limitar el alcance.

Ejemplos

Ejemplos 1 a 5

- 10 750 gramos de granos de girasol son molidos en un molino de cuchillas durante 1 minuto 30 (3 veces 30 segundos). El volumen de agua destilada necesaria es añadido al molino, mezclado y llevado a ebullición en un horno de microondas con el fin de desactivar las enzimas endógenas. Se detiene el calentamiento cuando comienza la ebullición. Paralelamente, la mezcla enzimática se realiza en un matraz. El matraz es sumergido en un baño maría a temperatura ambiente con el fin de evitar un choque térmico, estando las enzimas almacenadas a 4°C. El baño maría es encendido entonces con una temperatura de consigna de 50°C para que las enzimas sufran una elevación gradual en temperatura. Los granos molidos son vertidos en un fermentador de 2L y se inician la regulación de temperatura y la agitación. Cuando el medio alcanza 50°C, la mezcla enzimática es agregada a la reacción de hidrólisis inicial. El pH es próximo al pH óptimo de las enzimas y no necesita corrección. Al inicio de 4 horas, el medio de reacción es separado por medio de una centrífuga a 9000 g durante 15 minutos a 20°C. Se recuperan las diferentes fases.

Para los ejemplos 1, 3 y 4, la emulsión separada de la fase acuosa no es reciclada.

Para el ejemplo 2, la emulsión separada de la fase acuosa es reciclada.

- 25 Se mide el porcentaje en masa de aceite contenido en cada fracción extraída (aceite libre, fase acuosa + emulsión, fase sólida) con respecto a la totalidad de los aceites recogidos en las tres fracciones (aceite libre/fase acuosa + emulsión/fase sólida), sin reciclaje de la emulsión y con reciclaje de la emulsión.

A título de ejemplo comparativo, un lote de granos es tratado de la misma manera pero sin enzima (Ejemplo 5 comparativo).

Los resultados se indican en la Tabla II siguiente:

Tabla II

	Ej. 1 (inv.)	Ej. 2 (inv.)	Ej. 3 (inv.)	Ej. 4 (inv.)	Ej. 5 (comp.)
Tiempo (h)	4	4+reciclaje	12	4	4
Temperatura (°C)	50	50	50	50	50
Agitación (rpm)	340	340	340	340	450
pH	5.2	5.1	4.9	5.1	5.5
Relación granos/agua	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Relación enzima/grano	0.05	0.05	0.05	0.05	0
Betaglucosidasa ^a	12.7	12.7	12.7	20.2	0
Endocelulasa ^a	27.1	27.1	27.1	10.3	0
Exocelulasa ^a	9.4	9.4	9.4	0.7	0
Arabinasa ^a	468.6	468.6	468.6	3.4	0
Xilanasa ^a	8.4	8.4	8.4	0	0
Galactanasa ^a	775.8	775.8	775.8	153	0

ES 2 622 164 T3

Endopoligalacturonasa ^a	85.1	85.1	85.1	76.9	0
Pectina metilestearasa ^a	1.8	1.8	1.8	1.7	0
Ferulato estearasa ^a	3.8	3.8	3.8	4.2	0
Masa de aceite libre (g)	270.3	335.7	329.4	278.7	127.9
Masa aceite emulsión (g)	26.3	14.6	33.3	56.3	26.7
Masa aceite fase sólida (g)	56.5	32.18	35.6	72.7	197.0
Masa total aceite (g)	353.1	383.2	398.3	407.8	351.6
Masa aceite libre (%)	76.5	87.6	82.7	68.5	36.4
Masa aceite emulsión (%)	7.5	3.8	8.4	13.2	7.6
Masa aceite fase sólida (%)	16.0	8.4	9.0	17.3	56.0
^a actividad en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$					

5 El procedimiento según la invención permite obtener resultados próximos a los obtenidos por las industrias tradicionales que utilizan solventes. La emulsión obtenida contiene muy poco aceite. A título comparativo, queda generalmente 4-5% de aceite en la emulsión en los procedimientos tradicionales con solvente, y queda 10-15% de aceite en la emulsión en los procedimientos conocidos sin solvente, según los granos.

Las concentraciones en azúcares varían de 40 a 90 g/l de fase acuosa, para un tiempo de hidrólisis de 4 a 12 horas.

Ejemplo 6 a 12

Los Ejemplos 6 a 12 son tratados de la misma manera que los ejemplos anteriores pero sobre granos de colza sin reciclaje de la emulsión separada de la fase acuosa.

10 Para los ejemplos 6 y 7, la duración de la hidrólisis es de 15 horas. El ejemplo 6 está exento de actividad de ferulato estearasa.

A título de ejemplo comparativo, un lote de granos es tratado de la misma manera pero sin enzima (ejemplo 10 comparativo) o con las mismas enzimas pero con relaciones entre actividades que no hacen parte de la invención.

Los resultados se indican en la Tabla III siguiente:

15

Tabla III

	Ej. 6 (inv.)	Ej. 7 (inv.)	Ej. 8 (inv.)	Ej. 9 (inv.)	Ej. 10 (comp.)	Ej. 11 (comp.)	Ej. 12 (comp.)
Tiempo (h)	15	15	4	4	4	4	4
Temperatura (°C)	50	50	50	50	50	50	50
Agitación (rpm)	300	300	300	300	450	300	330
pH	5.0	4.9	5.0	4.9	5.2	5.0	5.1
Relación granos/agua	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
Relación enzima/grano	0.05	0.05	0.05	0.05	0	0.05	0.05
Betaglucosidasa ^a	8	8	8	4.7	0	1.39	24.3
Endocelulasa ^a	14	14	14	119.8	0	218.2	35.8
Exocelulasa ^a	2	2	2	25.3	0	29.2	13.0
Arabinasa ^a	10	10	10	1334.8	0	1511.1	697.0
Xilanasa ^a	0	0	0	1713.9	0	4139.1	12.6

ES 2 622 164 T3

Galactanasa ^a	450	450	450	1000.8	0	175.2	907.2
Endopoligalacturonasa ^a	57.9	57.9	57.9	61.7	0	0	126.62
Pectina metilestearasa ^a	3.5	3.5	3.5	0.3	0	0	0.95
Ferulato estearasa ^a	0	27	27	6.5	0	6.5	3.8
Masa de aceite libre (g)	180.9	202.0	51.7	118.8	15.0	91.4	70.0
Masa aceite emulsión (g)	58.5	45.7	176.53	114.0	188.8	114.5	158.9
Masa aceite fase sólida (g)	44.3	39.4	66.42	63.67	95.9	98.4	101.1
Masa total aceite (g)	284	287.3	295.2	296.6	299.7	304.6	330.1
Masa aceite libre (%)	63.7	70.3	17.5	40.1	5	30	21.2
Masa aceite emulsión (%)	20.6	15.9	59.8	38.4	63	37.6	48.1
Masa aceite fase sólida (%)	15.6	13.7	22.5	21.5	32	32.3	30.6
^a actividad en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$							

Los ejemplo 6 a 9 ponen en evidencia el papel de la ferulato estearasa.

El ejemplo 9 de una duración de 4 horas, muestra el papel del tiempo de hidrólisis. Todo como los ejemplos 7 y 8 realizados con la misma mezcla enzimática pero con una duración de hidrólisis diferente.

5 Las concentraciones en azúcares varían de 40 a 90 g/l de fase acuosa, para un tiempo de hidrólisis de 4 a 12 horas.

Las concentraciones en proteínas son de 30 a 35 g/l de fase acuosa desde la primera hora de hidrólisis.

10 Los ejemplos comparativos 10 a 12 muestran las ventajas de las relaciones de actividad de las mezclas enzimáticas utilizadas en el procedimiento de la invención con relación a los procedimientos sin enzima o utilizando mezclas enzimáticas que presentan relaciones de actividad diferentes de los de la presente invención. En particular, el procedimiento que utiliza las mezclas enzimáticas y no la invención permite obtener una masa más grande de aceite libre que los procedimientos que utilizan mezclas enzimáticas que presentan las relaciones de actividad diferentes de las de la presente invención.

Reivindicaciones

1. Procedimiento de extracción enzimática en medio acuoso de aceites, proteínas y azúcares fermentables a partir de material vegetal, que comprende las siguientes etapas:
 - a) adición de agua al material vegetal que presenta un tamaño de partícula apropiado,
 - 5 b) adición de una mezcla enzimática que contiene al menos una celulasa, al menos una hemicelulasa y al menos una peptinasa, estando la relación entre la actividad de la pectinasa y la actividad de la celulasa comprendida entre 0.3 y 2.5, y más preferiblemente entre 0.35 y 0.45 y estando comprendida la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la hemicelulasa entre 1.10^{-2} y 0.5, y más preferiblemente entre 1.10^{-2} y 2.10^{-2} , siendo la actividad de la peptinasa inferior a 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, y preferiblemente inferior a 100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, en la cual la cantidad de mezcla enzimática está comprendida entre 0.25% y 10% en volumen de la mezcla agua/material vegetal, preferiblemente entre 1% y 6%,
 - 10 c) incubación bajo agitación del material vegetal y de la mezcla enzimática para liberar en el medio de reacción aceites, proteínas y azúcares fermentables, durante una duración que depende de los rendimientos buscados,
 - 15 d) separación del medio de reacción para obtener aceite libre, una fase acuosa que contiene proteínas y azúcares fermentables, y una fase sólida,
 - e) eventualmente separación de una emulsión de aceite libre o de la fase acuosa, y reciclaje de la emulsión en el medio de reacción,
 - f) separación de las proteínas y de los azúcares fermentables de la fase acuosa.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el cual el tamaño de partícula apropiado del material vegetal es obtenido por molienda del dicho material vegetal.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el cual la masa de agua agregada al material vegetal es igual a 1 a 2 veces la masa del dicho material vegetal.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además, después de la etapa a) una etapa de desactivación de enzimas endógenas de la mezcla agua/material vegetal.
- 25 5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la mezcla enzimática contiene las actividades enzimáticas en las proporciones siguientes:
 - celulasas:
 - betaglucosidasa: entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 4.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - endocelulasa: entre 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 27 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 30 - exocelulasa: entre 0 y 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 25.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - hemicelulasas:
 - arabinasa: entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 465 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 1335 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - xilanasa: entre 0 y 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 1700 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 35 - galactanasa: entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 750 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 1000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - pectinasas:
 - endopoligalacturonasa: entre 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 61 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 40 - pectina metilestearasa: entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la mezcla enzimática comprende además una fenolato estearasa, preferiblemente una ferulato estearasa, cuya actividad está comprendida entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, y preferiblemente entre 4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.
- 45 7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la incubación según la etapa c) se realiza durante 2 a 20 horas, a una temperatura comprendida entre 25°C y 75°C.

8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la agitación prevista en la etapa c) se realiza por medio de un mezclador que comprende aspas planas que favorecen la mezcla y limitan el cizallamiento.
- 5 9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual no está prevista ninguna etapa de corrección del pH.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual la etapa de separación d) se realiza por medio de un Tricanter.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el cual el material vegetal se selecciona entre el grupo que comprende tortas grasas provenientes de la primera presión y granos de oleaginosas.
- 10 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el cual las oleaginosas son seleccionadas entre el grupo que comprende colza y girasol.
- 15 13. Utilización, en un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de una mezcla enzimática que contiene al menos una celulasa, al menos una hemicelulasa y al menos una peptinasa, estando comprendida la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la celulasa entre 0.3 y 2.5, y más preferiblemente entre 0.35 y 0.45 y estando comprendida la relación entre la actividad de la peptinasa y la actividad de la hemicelulasa entre $1 \cdot 10^{-2}$ y 0.5, y más preferiblemente entre $1 \cdot 10^{-2}$ y $2 \cdot 10^{-2}$, siendo la actividad de la peptinasa inferior a 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, y preferiblemente inferior a 100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, en la cual la cantidad de la mezcla enzimática está comprendida entre 0.25% y 10% en volumen de la mezcla agua/material vegetal, preferiblemente entre 1% y 6%, para suprimir cualquier etapa de corrección del pH en el dicho procedimiento.
- 20 14. Utilización según la reivindicación 13, según la cual la mezcla enzimática contiene las actividades enzimáticas en las proporciones siguientes:
- celulasas:
 - betaglucosidasa: entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 4.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - endocelulasa: entre 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 27 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,

25 - exocelulasa: entre 0 y 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 25.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,

 - hemicelulasas:
 - arabinasa: entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 465 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 1335 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - xilanasa: entre 0 y 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 1700 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,

30 - galactanasa: entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 750 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 1000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,

 - peptinasas:
 - endopoligalacturonasa: entre 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 61 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,

35 - pectina metilestearasa: entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, preferiblemente entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ y 5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.