

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 928**

51 Int. Cl.:

A61Q 19/00 (2006.01)
A23K 50/80 (2006.01)
A23K 10/30 (2006.01)
A23K 20/147 (2006.01)
A23L 33/185 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A23J 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2010 PCT/EP2010/001222**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **02.09.2010 WO10097238**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2010 E 10707826 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2400859**

54 Título: **Procedimiento para obtener preparados de proteínas a partir de semillas de girasol**

30 Prioridad:

27.02.2009 DE 102009010813

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

09.02.2018

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
 FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
 FORSCHUNG E.V. (100.0%)
 Hansastrasse 27c
 80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**PICKARDT, CLAUDIA;
 EISNER, PETER;
 BADER, STEPHANIE;
 WILD, FLORIAN y
 MÜLLER, KLAUS**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 653 928 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para obtener preparados de proteínas a partir de semillas de girasol

5 **Campo técnico de aplicación de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para obtener preparados de proteínas a partir de semillas de girasol así como a los preparados de proteínas con propiedades de aplicación mejoradas y que pueden producirse con el procedimiento.

10

Estado de la técnica

Los preparados de proteínas encuentran muchas aplicaciones en alimentos como ingredientes activos con funciones técnicas o nutricionales. Existen preparados de proteínas con un valor proteínico especialmente alto para su uso como complementos nutricionales de alta calidad (alimentación para bebés, alimentación especial, alimentación para deportistas). Estos también son en principio de interés para la formulación de dietas en las que se debe garantizar una cantidad alta de proteínas. Otros preparados de proteínas tienen una buena funcionalidad técnica y son, por ejemplo, adecuados para estabilizar espumas o emulsiones o para formar geles. Estos preparados de proteínas son principalmente adecuados como ingredientes de alimentación y también encuentran aplicación en dietas especiales o para fines técnicos.

20

En principio, puede distinguirse entre los preparados de origen animal y vegetal. Ejemplos de preparados de proteínas de origen animal son por ejemplo los obtenidos de huevo de gallina, leche, suero o caseína y preparados de gelatina a partir de despojos. Estos preparados presentan el inconveniente de que tienen un sabor y olor característico y por ello su uso se limita a ciertas aplicaciones. Normalmente su fabricación es costosa y presenta problemas relacionados con alergias y también son rechazados por ciertos consumidores por razones éticas.

25

En los preparados de proteínas vegetales se distingue, en base a la producción y al contenido de la proteína resultante, entre concentrados de proteínas y aislados de proteínas. Los aislados de proteínas tienen un contenido proteínico de al menos un 90%, que es muy alto en comparación al contenido de los concentrados de proteínas vegetales con un contenido proteínico de entre un 60% y 90%. Para producir aislados de proteínas las proteínas se disuelven en agua y a continuación son aisladas de la solución acuosa. Por ello éstos presentan un perfil de aminoácidos y propiedades nutricionales y técnicas alteradas.

30

Como preparados de proteínas vegetales se encuentran disponibles en el mercado principalmente preparados de proteínas de soja, es decir concentrados y aislados de proteínas de soja, así como preparados de gluten de trigo. También se ofrecen preparados de proteínas de otras proteínas de leguminosas como, por ejemplo, concentrados de proteínas de guisantes.

35

Igualmente se conocen preparados de proteínas vegetales, concentrados de proteínas y aislados de proteínas, obtenidos a partir de semillas oleaginosas a las que se les ha exprimido el aceite, como, por ejemplo, semillas de colza y de girasol. Sin embargo, éstas se utilizan actualmente casi exclusivamente para la obtención de aceite. A pesar de su alto potencial nutricional y funcional-técnico, los residuos resultantes del prensado y la extracción (torta de prensado y molienda) hasta ahora no se utilizan en la industria de la alimentación, en comparación con la soja. Una razón para ello es la cantidad de impurezas contaminantes tales como polifenoles, que afectan al sabor y al color de los productos.

40

45

La exprimición de aceite de semillas oleaginosas y de las leguminosas se realiza según el estado de la técnica con hexano. Alternativamente, las semillas oleaginosas son floculadas y su aceite obtenido directamente o mecánicamente en una primera parte (pre-prensado) y exprimido completamente a continuación, la torta de prensado debiendo ser triturada antes de la extracción para hacer posible la extracción. También se realiza un prensado final hasta que el contenido de aceite residual es de aproximadamente un 5% sin extracción subsiguiente, reduciendo el contenido de aceite residual en el expeller extraído (torta de prensado, cáscaras) la estabilidad de almacenamiento.

50

55

Hasta ahora la mayoría de las semillas de girasol se utilizan para la extracción del aceite no peladas o peladas hasta un máximo de 2/3. En particular para el prensado, es decir para el prensado final o para el pre-prensado como exprimición de aceite incompleta, un alto contenido de cáscara se considera necesario. En estos casos, la torta de prensado y el granulado son de color oscuro y tienen un contenido de fibra cruda muy alto. Por ello no son adecuados para la producción de harinas y concentrados de proteínas de alta calidad.

60

Existen distintas aproximaciones para aislar proteínas de los residuos de la obtención de aceite de girasol. En un primer plano se encuentra la separación de polifenoles contaminantes, principalmente ácido clorogénico, que empeora el color de los aislados de proteínas de girasol. Para ello, hasta ahora se han propuesto extracciones con diversos disolventes, incluyendo agua y alcoholes, para separar los polifenoles de las cáscaras de girasol a las que se les ha exprimido el aceite. La obtención de aislados de proteínas a partir de semillas y torta de prensado o de

65

cáscaras de girasol es especialmente complicada debido a la baja solubilidad en agua de las proteínas de girasol, que requieren el uso de álcalis o sales. Esto conlleva a la necesidad de una cantidad de agua especialmente alta para el procesado (lavado) de proteínas, asociada a altas pérdidas de proteínas, lo que aumenta el coste de producción de los aislados de proteínas y por tanto limita su espectro de aplicación.

5 Para separar las sustancias fenólicas con propiedades activas de dar color de las semillas de girasol a las que se les ha extraído la grasa para la subsiguiente obtención de proteínas y de aislados de proteínas a partir del material preparado de este modo, se han ensayado distintas mezclas alcohólicas acuosas, en particular butanol en diferentes proporciones con agua de ácido clorhídrico, etanol en un 95% (v/v), isopropanol en un 70% (v/v) y metanol en un 80% (v/v). Una desventaja en la extracción con estos disolventes es la gran desnaturalización de las proteínas por el tratamiento del disolvente, reduciéndose la solubilidad de las proteínas considerablemente. De este modo la subsiguiente extracción de proteínas en la producción de aislados de proteínas así como su funcionalidad se limita considerablemente.

15 En el documento WO02/060273A1 se describe un procedimiento con el que se obtienen aislados de proteínas con un contenido de proteína de más del 90% a partir de semillas de girasol. Para ello, las proteínas se extraen disueltas en agua y obtenidas a bajas temperaturas por precipitación con alcohol. Estas proteínas son costosas debido al alto consumo de energía para la refrigeración y por tanto su aplicación está limitada. En el artículo 'Obtención de harina y de un concentrado proteínico a partir de semillas de *Heliantus annus* y su incorporación en galletas', Hector Bourges R. *et al.*, Archivos latinoamericanos de nutrición, vol. XXX, nº 4, 1980, páginas 564-579, se describe la producción de concentrados proteínicos a partir de semillas de girasol que se obtienen a través de las etapas de, entre otras, pelar las semillas de girasol, tratamiento térmico, prensado, trituración de la torta de prensado y extracción por disolvente mediante hexano.

25 La producción de concentrados y aislados de proteínas a partir de semillas de girasol a través de la extracción por disolvente se describe en 'Sunflower Protein Concentrates and Isolates Low in Polyphenols and Phytate', Mohammad Saeed, Munir Cheryan, Journal of Food Science, vol. 53, nº 4, 1998, páginas 1127-1131.

30 Las ventajas de producir preparados de proteínas a partir de cáscaras de semillas de girasol lo más enteras posibles se describe en 'Preparation and application of vegetable proteins, especially proteins from sunflower seed, for human consumption. An approach', B. Grassmann, Die Nahrung, vol. 27, nº 4, 1983, páginas 351-369, así como en 'Almost Complete Dehulling of High Oil Sunflower Seed', L. Tranchino *et al.*, JAOCS, vol. 61, nº 7, 1984, páginas 1261-1265. Los concentrados de proteínas de semillas de girasol se obtienen a través de un tratamiento de secado o humedecimiento técnico en el que la proteína permanece en el residuo. La alta proporción de sustancias acompañantes no deseadas limita su uso en el sector de la alimentación. En general, los concentrados proteínicos vegetales conocidos, que tienen un bajo grado de pureza, están limitados en su funcionalidad y/o contienen una cierta proporción de componentes contaminantes que pueden afectar muy negativamente al valor nutricional, color, olor y/o sabor, de los alimentos o comidas que los contienen. Por ello los concentrados proteínicos de semillas de girasol tienen un espectro de aplicación limitado y sólo pueden utilizarse en pequeñas concentraciones.

40 El objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento económico para producir preparados de proteínas que sean sensorialmente atractivos y de utilización versátil.

Presentación de la invención

45 Este objetivo se consigue mediante el procedimiento de la reivindicación 1. Las reivindicaciones adicionales especifican realizaciones preferibles del procedimiento. En el procedimiento propuesto para obtener preparados de proteínas a partir de semillas de girasol se realizan al menos las siguientes etapas:

50 - Pelar las semillas de girasol hasta que tengan un contenido de cáscara residual $\leq 5\%$ en peso o proporcionar semillas de girasol peladas que tengan un contenido de cáscara residual $\leq 5\%$ en peso (en cada caso con respecto a la masa total de la fracción de núcleo de la semilla resultante inmediatamente después del pelado);

55 - Exprimir parcialmente el aceite de las semillas de girasol peladas por medios mecánicos de prensado, hasta un contenido de grasa o aceite en las semillas de girasol peladas en el intervalo de entre un 10 a 35% en peso, obteniendo una torta de prensado en la forma de gránulos o filamentos que tiene un espesor en el intervalo de entre 0,2 y 4 cm; y

60 - Realizar una o varias etapas de extracción con al menos un disolvente para obtener una harina con contenido proteínico y sin grasa como preparado de proteínas. Al menos una de las etapas de extracción se efectúa de tal manera que se produce una exprimición adicional de aceite de las semillas de girasol peladas y con aceite parcialmente exprimido.

65 Mediante la combinación del bajo contenido de cáscara residual y la exprimición parcial de aceite por medios mecánicos hasta el contenido de aceite residual especificado pueden obtenerse concentrados de proteínas que tienen propiedades muy beneficiosas tanto visuales como funcionales para su uso en el área de la alimentación o la dietética. El procedimiento hace posible un tratamiento de las proteínas especialmente suave al evitarse una temperatura demasiado elevada durante la exprimición de aceite mecánica y/o adicional, que puede llevar a cambios indeseados en las proteínas y en el aroma.

La exprimición parcial de aceite de las semillas de girasol por medios mecánicos hasta los contenidos especificados de aceite residual se realiza preferiblemente de manera que se obtiene una torta de prensado estable mecánicamente con un espesor en el intervalo de entre 0,5 y 2 cm. De este modo, las subsiguientes etapas del procedimiento se simplifican ya que, debido a la porosidad y espesor de la torta de prensado, puede prescindirse de una trituración por medios mecánicos previa a la extracción adicional.

El procedimiento inventivo hace posible también una producción suave del preparado en el sentido de que permite una desnaturalización de las proteínas de manera específica. Así, la exprimición de aceite parcial y la una o varias etapas de extracción se realizan de manera que el grado de desnaturalización de las proteínas en la harina con contenido proteínico y sin grasa (en relación al producto de partida del procedimiento) es como máximo un 40%, preferentemente entre un 10% y 30%. Esto hace posible obtener preparados proteínicos de alto valor, cualitativa y sensorialmente, con un amplio espectro de aplicación.

Preferiblemente, la extracción se realiza con un disolvente o mezcla de disolventes en varias etapas de extracción que comprenden una combinación de al menos una etapa de extracción lipofílica con un disolvente o mezcla de disolventes lipofílicos y al menos una etapa de extracción hidrofílica con un disolvente o mezcla de disolventes hidrofílicos. Además, la concentración del disolvente de extracción en la última etapa de extracción preferiblemente se incrementa, lo que permite que un secado subsiguiente pueda hacerse de manera especialmente simplificada y suave.

El preparado de proteínas a partir de semillas de girasol producido con el procedimiento tiene un contenido proteínico de al menos un 50%. Es accesible para una producción económica ya que puede evitarse una purificación elevada, como se requiere en los aislados de proteínas.

Sorprendentemente, el preparado de proteínas comprende, a pesar de la alta proporción de sustancias que no son proteínas, propiedades que son similares a las de los aislados de proteínas conocidos obtenidos a partir de estas materias primas o incluso más variadas que éstas. Debido a su color claro así como a su espectro técnico funcional equilibrado en la forma de las funcionalidades de retención de agua, de retención de aceite y emulsionantes, el preparado de proteínas es utilizable de manera versátil, entre otros, en alimentación y dietética, para retener agua y/o retener aceite y/o formar una emulsión. El preparado de proteínas es adecuado para sustituir otros preparados que hasta ahora se han utilizado para estas funcionalidades y que son de origen animal o vegetal, como huevos de gallina, leche, soja en forma de aislados de proteína de soja, etc.

Ya en la forma de la harina de semillas de girasol que puede producirse de manera especialmente económica, es decir de la harina con contenido proteínico sin grasa obtenida directamente a partir del procedimiento de la invención, el preparado de proteínas exhibe sorprendentemente propiedades relacionadas con el color y funcionales que permiten utilizar la harina de proteínas directamente en múltiples aplicaciones de alimentación y dietética.

El espectro de aplicación del preparado de proteínas puede incluso ampliarse si el preparado de proteínas está libre de los aromas propios de siembra o vegetales, en particular si está sustancialmente libre de olor o sabor. Esto evitará, entre otros efectos, que la incorporación del preparado de proteínas en alimentos y dietas altere indeseablemente el sabor y el aroma.

Asimismo, el rango de aplicación puede ampliarse mediante la obtención de la funcionalidad de formación de espuma, de manera que el preparado de proteínas puede utilizarse para producir alimentos espumosos, por ejemplo, como un sustituto de la clara de huevo de gallina u otros aditivos de formación de espuma.

Preferiblemente, el preparado de proteínas tiene un contenido bajo en grasa, por lo que se garantiza una buena estabilidad de almacenamiento del preparado de proteínas.

Además preferiblemente, el preparado de proteínas tiene un contenido bajo en ácido fítico, oligosacáridos y/o ácidos fenólicos. De este modo el contenido de sustancias que pueden afectar a la utilización de nutrientes durante la digestión se reduce.

Breve descripción de los dibujos

A continuación se explican con mayor detalle y en relación con los dibujos el procedimiento de producción propuesto así como el preparado de proteínas que puede producirse con el mismo. Se muestran:

Fig. 1 esquemáticamente, un ejemplo de desarrollo del procedimiento propuesto que comprende un fraccionamiento de las semillas de girasol que contienen ácido fenólico en aceite, polifenoles y concentrado de proteínas, así como un fraccionamiento adicional opcional en aislados de proteínas; los usos de las fracciones individuales están escritos en cursiva;

Fig. 2 una representación para determinar el grado de prensado óptimo en relación a la estabilidad mecánica y para obtener la extractabilidad de las tortas de prensado y las propiedades funcionales de los preparados producidos a partir de las mismas; y

5 Fig. 3 esquemáticamente, otro ejemplo de desarrollo del procedimiento propuesto con las etapas de pelado, prensado y extracción por hexano (alternativamente: exprimición de aceite con scCO₂ o con alcohol), subsiguiente extracción por alcohol-agua, secado de supresión de alcohol-agua y subsiguiente molienda fina.

Formas de realización de la invención

10 El procedimiento inventivo puede realizarse por ejemplo de la siguiente manera. Como producto de partida se eligen preferiblemente variedades de semillas de girasol del tipo comestible o las que tienen una cáscara clara. Sin embargo también pueden utilizarse semillas normales de girasol y de las que se obtiene aceite de alto oleico.

15 La materia prima preparada se extrae en un dispositivo de extracción consecutivamente con distintos disolventes y con la condición de que ninguna o una muy pequeña cantidad de proteínas se disuelva. Esto minimiza la pérdida o la alteración de proteínas. En particular es ventajoso que la extracción con disolvente se realice con alcohol, por ejemplo con etanol, propanol, isopropanol.

20 Por supuesto, también pueden utilizarse varios dispositivos de extracción para los distintos disolventes. Lo mismo se aplica a los dispositivos de secado.

El procedimiento completo comprende las tres etapas de selección y preparación de las materias primas, exprimición parcial de aceite por medios mecánicos así como extracción, y se representa esquemáticamente en la figura 1. Otro ejemplo de realización preferente se muestra en la figura 3.

25

1. Selección y preparación de materias primas:

30 Considerable eliminación de las cáscaras mediante una técnica adecuada de manera que el contenido de cáscara residual con respecto a la fracción de núcleo de la semilla resultante pelada es $\leq 5\%$ en peso, preferiblemente $\leq 1\%$ en peso. Para ello se seleccionan de forma especialmente preferente variedades y tipos de materias primas que sean intencionadamente fáciles de pelar, en particular semillas comestibles en vez de semillas de aceite. Las especificaciones de contenido de cáscara residual en la presente solicitud de patente se refieren a la masa total de la fracción de núcleo resultante inmediatamente después del pelado.

35 Un acondicionamiento intencionado y/o secado asegura que procedimientos enzimáticos se eviten o controlen durante la separación de aceite. Esto puede ser necesario antes o después del pelado.

2. Separación parcial de aceite por medios mecánicos

40 Prensado de las semillas de girasol con poca cáscara por prensado de tornillo, controlando la temperatura, en su caso el enfriamiento, a menos de 80°C, preferiblemente a menos de 60°C, más preferiblemente a menos de 50°C. Esto reduce la aparición de reacciones de Maillard y otras alteraciones en las proteínas además de reacciones de otras sustancias contaminantes con proteínas, por ejemplo polifenoles.

45 El prensado se realiza hasta un contenido de aceite residual de un 10-35% en peso, preferiblemente un 12-25% en peso, más preferiblemente entre un 17 y 25%. El prensado se realiza con una geometría de prensado o tobera que permite la formación de tortas de prensado estables, en la forma de gránulos o pellets o bien de filamentos, los cuales no están sin embargo muy comprimidos y tienen una cierta porosidad.

50 Mediante una elección adecuada de la configuración de prensado (en particular de la geometría de tobera), los gránulos sorprendentemente se fijan entre sí muy bien con el contenido de aceite residual anteriormente especificado, lo que hace posible una separación adicional con un disolvente sin una trituración subsiguiente, a pesar de la baja proporción de cáscara. Los inventores han encontrado que puede lograrse un buen aprovechamiento de semilla y una forma de producto ventajosa para la extracción mediante la exprimición parcial de aceite por medios mecánicos en prensas de tornillo, de manera que puede prescindirse de una trituración o preparación adicional para las etapas de extracción adicionales subsiguientes. En este sentido se ha encontrado que el contenido de aceite residual obtenido está relacionado con las propiedades mecánicas de tal manera que existe un grado de exprimición de aceite óptimo en el que las propiedades de la torta de prensado son ideales, como se muestra en la figura 2. El grado óptimo de exprimición de aceite en este ejemplo se da con un contenido de aceite residual de aproximadamente un 17-20%.

55 Resulta especialmente ventajoso para la eficiencia de las etapas de extracción adicionales realizar la exprimición parcial de aceite por medios mecánicos hasta un contenido de aceite o grasa de las semillas de girasol peladas con el que se consiga una torta de prensado estable y con un espesor en el intervalo entre 0,5 y 2 cm mediante el prensado.

65

El prensado se realiza con una geometría de prensa o tobera que permite la formación de tortas de prensado estables, en la forma de gránulos (pellets) o filamentos. Resulta especialmente ventajoso utilizar para el prensado una prensa de tornillo con una matriz de orificio redondo o una tobera o un extrusor con tobera redonda, de manera que los compactos resultantes se obtienen como filamentos de sección transversal redonda de 5-20 mm de diámetro. Mediante la elección de un grado de compactación, con el que el contenido de grasa residual esté en el intervalo de entre un 12 y 25%, los compactos se obtienen con una porosidad suficiente para la extracción y una buena resistencia. De este modo, los filamentos compactados se obtienen con una resistencia de rotura entre 2 y 10 N/mm², idealmente entre 4 y 8 N/mm², con una densidad aparente de entre 300 y 500 Kg/m³.

3. Extracción de las semillas preparadas o de los gránulos de torta de prensado:

Preferiblemente, la extracción adicional se efectúa mediante la combinación de al menos dos disolventes de extracción de diferente polaridad de tal manera que las sustancias contaminantes hidrofílicas contenidas se extraigan antes, durante o después del aceite. Por disolvente de extracción se entienden en adelante todos los fluidos puros y soluciones (por ejemplo disolventes orgánicos o agua o soluciones acuosas o gases supercríticos) y mezclas de fluidos que se utilicen para la extracción. De este modo, se establecen al menos dos cambios de polaridad por aplicación sucesiva de los disolventes de extracción. Esto puede establecerse de forma continua o discontinua, mezclando o sustituyendo el disolvente de extracción existente previamente con el siguiente. Todos los disolventes permitidos para alimentación, como tales, así como mezclas de los mismos son adecuados, en particular agua, ácidos, alcoholes, ésteres, cetonas, por ejemplo acetona, éter, alcanos como n-hexano e iso-hexano, cuya polaridad y solubilidad en general disminuyen en el orden mencionado (de hidrofílico a lipofílico), así como fluidos supercríticos y gases, por ejemplo scCO₂ (CO₂ supercrítico), que es bastante lipofílico en el punto crítico y cuya polaridad puede ser modificada adicionalmente incrementando la presión adicionalmente en la dirección de hidrofiliidad así como incrementando la temperatura.

Por tanto, las siguientes etapas pueden llevarse a cabo por ejemplo de tal manera que el orden de las etapas hidrofílicas y lipofílicas se elija preferiblemente de manera que la extracción total proporcione un máximo rendimiento (es decir al menos un 90% del rendimiento que puede obtenerse con el disolvente puro):

- Extracción de sustancias moderadamente hidrofílicas acompañantes, en particular ácidos fenólicos y sustancias aromáticas, mediante alcohol, preferiblemente isopropanol, etanol o metanol, en una concentración en la que las proteínas no se disuelven o sólo en pequeña cantidad. Para ello se selecciona una concentración de alcohol mayor que un 60%, preferiblemente entre un 60 y 80% (concentración de porcentaje en volumen del alcohol en el disolvente de extracción). Además, puede utilizarse también scCO₂ como disolvente, preferiblemente a una temperatura entre 40 y 80°C y a una presión mayor de 300*10⁵ Pa, preferiblemente en el intervalo de 350-800*10⁵ Pa, presentado más propiedades hidrofílicas cuando mayor es la presión.

- Extracción de componentes lipofílicos con un disolvente lipofílico hasta la exprimición completa de aceite con un contenido de aceite residual de al menos 5% (Método de Büchi según Cavielzel). Como disolventes lipofílicos pueden utilizarse, por ejemplo, hexano, alcohol puro (≥ 95%) o scCO₂ a una temperatura en el intervalo de 31-60°C y una presión en el intervalo de 74-350*10⁵ Pa. De este modo se extraen en particular aceite, fosfolípidos y otros componentes lipofílicos tales como, por ejemplo, carotenoides.

- Dado el caso, repetición de la primera extracción después de la segunda extracción.

En caso necesario, la extracción lipofílica puede realizarse antes de la extracción hidrofílica.

Ventajosamente, la polaridad del disolvente de extracción se modifica mediante agua residual existente después del pre-tratamiento, en particular después de la exprimición previa de aceite por medios mecánicos, o durante la extracción de aceite de manera que durante el procedimiento de extracción con un único disolvente añadido se originan diferentes polaridades de la mezcla de extracción efectiva.

Mediante la utilización de gases supercríticos, en particular de dióxido de carbono supercrítico (scCO₂), la polaridad puede ser modificada únicamente cambiando la presión y la temperatura, no requiriéndose la adición de un disolvente adicional para cambiar de polaridad. Mediante la sucesiva retirada del agua retenida en las materias primas, la polaridad se puede modificar casi continuamente durante la extracción.

De forma especialmente ventajosa, la polaridad hidrofílica se ajusta primero de manera que el agua residual retenida en las materias primas pueda ser utilizada para modificar la polaridad de tal manera que las sustancias hidrofílicas puedan extraerse sin adición de agua o con muy poca agua añadida. Sorprendentemente, esto causa al mismo tiempo una disminución del contenido de agua residual durante la transición a la fase de extracción lipofílica, propiciando la extracción lipofílica. Mediante la retirada del agua o durante la primera extracción puede prescindirse de un secado convencional antes de la exprimición de aceite. Normalmente después del prensado se requeriría un acondicionamiento ya que, con el contenido de agua relativamente incrementado en la torta de prensado, debido al

contenido de aceite reducido y la masa total resultante más pequeña, la separación de aceite con el disolvente lipofílico sería más difícil.

5 Resulta especialmente ventajoso que el primer disolvente o los residuos del primer disolvente, por ejemplo del alcohol o mezcla de alcohol, se expulsan con el subsiguiente segundo disolvente.

10 Opcionalmente, puede ser necesario retirar completamente el agua con alcohol de antemano para evitar efectos adversos del agua en la extracción subsiguiente. La concentración de alcohol se aumenta en la primera extracción hasta que el alcohol pueda disolverse a continuación mediante el disolvente lipofílico. Una separación selectiva a diferentes niveles de presión cuando se utiliza scCO_2 hace posible la separación considerable de la fase de alcohol. Las propiedades de disolución pueden modificarse adicionalmente mediante el agua contenida en las materias primas o agua añadida u otros codisolventes, de manera que es posible la obtención de sustancias reciclables moderadamente polares. Mediante la combinación de altas presiones ($> 500 \cdot 10^5$ Pa) y de una temperatura entre 40 y 60°C se consiguen mejores razones de extracción de los ácidos fenólicos y de las sustancias de aceite acompañantes. La introducción del segundo disolvente (aparte del agua) en la fase supercrítica del agua puede facilitar también la extracción de los ácidos fenólicos y otras sustancias acompañantes, por ejemplo, pigmentos y sustancias aromáticas. Las condiciones de extracción se ajustan ventajosamente con scCO_2 , de manera que tanto el agua como residuos de alcohol pueden expulsarse sucesivamente del refinado y una eliminación de la disolución a altas temperaturas deja de ser necesaria. Esto puede evitarse con un secado subsiguiente del refinado incluso cuando se utiliza agua como promotor/modificador.

25 Durante la utilización de alcohol acuoso la extracción se realiza por medio del disolvente de extracción en varias etapas de extracción, siendo el contenido de alcohol en el disolvente de extracción óptimamente incrementado, al menos en la última transición desde una primera a una segunda etapa de extracción, es decir hasta la concentración de azeótropo acuoso de, por ejemplo, 96% (en volumen) para etanol, de manera que la concentración de alcohol en la mezcla de extracción aumenta a más del 90% (en volumen). Esto permite configurar el secado subsiguiente de forma especialmente suave ya que la proporción de agua residual a retirar se reduce, al evaporarse menos rápidamente y a una temperatura más alta que el alcohol.

30 Por supuesto, la extracción adicional (posterior a la exprimición parcial de aceite por medios mecánicos) puede realizarse también con un solo disolvente, en particular hexano, para obtener la harina de contenido proteínico sin grasa.

35 La extracción se realiza bajo las condiciones de que las proteínas no se introduzcan en la disolución o sólo en una pequeña cantidad y de que las proteínas no se dañen o sólo mínimamente, no produciéndose ninguna reacción química indeseada o sólo unas pocas, tales como la reacción de Maillard o la adición de Michael de ácidos fenólicos (por ejemplo medibles como máximo en un 20% de menos ácidos fenólicos y/o lisina disponible y/o azúcares reducibles o como máximo en un 10% de más lisinoalanina o productos de Maillard). Además, no se produce en el material extraído ningún cambio de aroma inducido térmicamente a las temperaturas fijadas. Para ello la temperatura se mantiene debajo de 80°C, mejor a $\leq 60^\circ\text{C}$, idealmente debajo de 40°C. Si se realiza una exprimición de aceite por hexano, la disolución completa puede mejorarse generando un vacío (100-800 hPa, preferiblemente 200-500 hPa, más preferiblemente 200 hPa), siendo la disolución posible a una temperatura de como máximo 60°C. Mediante otros disolventes, la aplicación de vacío opcional puede ser igualmente beneficiosa para permitir la disolución a bajas temperaturas.

45 Puede observarse que es especialmente ventajoso que en las proteínas de girasol se presente una desnaturalización determinada de un 5%-40%, especialmente de manera adecuada entre un 10% y 30% (por ejemplo medible como una desviación de no más de un 30%, mejor 20%, aún mejor 10%, respecto a propiedades funcionales como la solubilidad de proteínas, como mucho un 30% mayor de desnaturalización de proteína medible por métodos de análisis termodinámico tales como DSC), -basada en proteínas del producto de partida del procedimiento propuesto-, con objeto de obtener un espectro de aplicación amplio.

50 El orden de la extracción también se puede invertir cuando, por ejemplo, las sustancias extraídas deban poderse utilizar para aplicaciones específicas. La separación completa de aceite en la primera etapa puede ser ventajosa en términos de la obtención de sustancias acompañantes como ingredientes comestibles o para aplicaciones técnicas o cosméticas. Resulta especialmente ventajosa la combinación de la separación de aceite con CO_2 supercrítico, subsiguiente extracción de disolvente alcohólico (acuoso) y tratamiento de scCO_2 final para eliminar la disolución y secado para formar los productos estables finales. La combinación se configura preferiblemente de manera que todas las extracciones se realizan una detrás de la otra en un contenedor, modificando únicamente los disolventes, temperaturas y presiones.

60 Sorprendentemente, de este modo las fracciones aprovechables de proteínas y las de fenoles pueden obtenerse al mismo tiempo y ambas ser utilizadas para diferentes aplicaciones de alimentación. Las sustancias acompañantes contenidas en el alcohol pueden ser utilizables directamente para aplicaciones de alta calidad o ser procesadas adicionalmente. También resulta especialmente ventajoso utilizar scCO_2 antes o durante la extracción de polifenoles ya que la retirada de oxígeno evita una oxidación.

Sorprendentemente se observa también que, mediante la utilización de alcohol, la reducción de los fosfolípidos mejora en comparación con una extracción por hexano pura, de manera que la calidad sensorial de las harinas en los que se ha separado el aceite se mejora adicionalmente.

5 Adicionalmente se observa que la fracción proteínica puede obtenerse libre de sustancias aromáticas inducidas térmicamente y que su uso en la alimentación mediante preparados de proteínas sensorialmente neutras se mejora. Al mismo tiempo, las propiedades funcionales de las proteínas se preservan.

10 Mediante el procedimiento de producción descrito anteriormente puede obtenerse un preparado de proteínas de girasol que se caracteriza por un perfil nutricional y un espectro funcional técnico equilibrados, por ejemplo en comparación con los aislados de proteínas que se obtienen mediante fraccionamiento acuoso y procedimientos de aislamiento complejos. El preparado de proteínas también es adecuado para obtener, por ejemplo, el alto contenido proteínico de un aislado de proteínas, entre otros, como ingrediente de alimentación o dietético, sin requerir un tratamiento adicional. Sorprendentemente, aunque el preparado de proteínas no es un aislado de proteínas, muestra propiedades funcionales técnicas de aislado de proteínas. Tiene un color brillante neutral y está sustancialmente libre de sustancias acompañantes que afecten sensorialmente o que sean anti-nutricionales. En particular, el concentrado de proteínas de girasol no presenta prácticamente ningún olor o sabor característico.

20 Es especialmente ventajoso que la harina de proteínas de girasol de la que se ha exprimido el aceite (SBPM) tenga un color extraordinariamente atractivo y una funcionalidad muy distintiva y que sea adecuada para numerosas aplicaciones de alimentación y dietética.

25 A continuación, se recurre a los siguientes procedimientos de determinación para caracterizar cuantitativamente los preparados de proteínas producidos:

- Contenido proteínico:

30 El contenido proteínico se define como el contenido calculado a partir de la determinación de nitrógeno y su multiplicación por un factor de 6,25. El contenido proteínico se puede indicar, por ejemplo, porcentualmente respecto a la masa seca (TS).

- Color

35 El color perceptible se define mediante la medida de color CIE-L*a*b* (ver DIN 6417). El eje L* especifica el brillo, teniendo el color negro el valor de 0 y el blanco el valor de 100, el eje a* describe la parte de color verde o rojo y el eje b* la parte de color azul o amarillo.

- Solubilidad proteínica:

40 La solubilidad proteínica se determina mediante los procedimientos de determinación de acuerdo con Morr, entre otros, 1985 (ver el artículo científico: Morr CV, German, B., Kinsella, JE, Regenstein, JM, Van Buren, JP, Kilara, A., Lewis, BA, Mangino, M.E, "A Collaborative Study on Developing a Standardized Food Protein Solubility Procedure, Journal of Food Science, vol. 50 (1985), páginas 1715-1718). De este modo, el preparado de proteínas se añade a una parte de masa-volumen de 1:25 a 1:50 (en porcentaje de volumen) (es decir, 1-2 g del preparado de proteínas sobre 50 ml de disolución) en una disolución de 0,1 M de NaCl a temperatura ambiente y mantenida a pH 7 utilizando 0,1 M de una disolución de HCl o NaOH durante aproximadamente 60 minutos y removiendo a aproximadamente 200 rpm y el sedimento no disuelto siendo entonces centrifugado durante 15 minutos a 10.000 veces la aceleración de la gravedad (20.000g). La solubilidad proteínica se puede especificar, por ejemplo, porcentualmente, de manera que una solubilidad proteínica de x% significa que un x% de la proteína presente en el preparado se recupera en el aclarado remanente si se utiliza dicho método.

- Retención de agua:

55 La capacidad de retención de agua se define por medio del procedimiento (en adelante denominado procedimiento de determinación AACC) que se especifica en: American Association of Cereal Chemists, "Approved Methods of the AACC". 10th ed., AACC. St. Paul, MN, 2000b; Method 56-20. "Hydration capacity of pregelatinized cereal products". La capacidad de retención de agua se puede especificar, por ejemplo, en ml/g, es decir mililitros de agua retenida por gramo de preparado, y se determina de acuerdo con el procedimiento de determinación AACC por medio del peso del sedimento saturado con agua menos el peso del preparado seco tras mezclar aproximadamente 2 g de preparado de proteínas con aproximadamente 40 ml de agua durante 10 minutos y centrifugar a 1.000g durante 15 minutos a 20°C.

- Retención de aceite:

La capacidad de retención de aceite se define por medio del procedimiento (en adelante denominado método de determinación de retención de grasa) que se especifica en: Ludwig I., Ludwig, E., Pingel B., "Ein Mikromethode zur Bestimmung der Fettbindkapazität". Nahrung/Food, 1989, 33 (1), 99.

La capacidad de retención de aceite se puede especificar, por ejemplo, en ml/g, es decir mililitros de aceite retenido por gramo de preparado, y se mide de acuerdo con el procedimiento de determinación anteriormente referido como volumen del sedimento de aceite retenido tras mezclar 1,5 g de preparado de proteínas con 15 ml de aceite de maíz durante 1 minuto y centrifugar a 700g durante 15 minutos a 20°C.

Capacidad de emulsión:

La capacidad de emulsión se determina por medio de un método de determinación (en adelante denominado método de medición de conductividad) en el que, a una suspensión de un 1% del preparado de proteínas de 100 ml, pH 7, se añade aceite de maíz hasta la inversión de fase de la emulsión de aceite a agua. La capacidad de emulsión se define como la máxima capacidad de absorción de esta suspensión, determinada por medio de la disminución espontánea en la conductividad durante la fase de inversión (ver el artículo científico de Wäsche, A., Muller, K., Knauf, U., New Processing of Lupine Protein Isolates and functional properties". Nahrung/Food, 2001, 45, 393-395) y se puede especificar, por ejemplo, en ml de aceite/g, es decir mililitros de aceite emulsionado por gramo de preparado de proteínas.

Actividad espumante:

La actividad espumante se especifica porcentualmente, medida como el incremento de volumen de una disolución de 5%, pH 7, tras una carga durante 8 minutos a nivel 3 (591 rpm) en una procesadora de alimentos estándar de tipo Hobart 50N (caldera de acero de 5 litros) con batidor (de alambre).

Densidad de espuma:

La densidad de espuma se especifica en g/l, es decir como masa de la espuma por unidad de volumen, y se mide tras una carga de una disolución de 5%, pH 7, durante 8 minutos a nivel 3 (591 rpm) en una procesadora de alimentos estándar de tipo Hobart 50N (caldera de acero de 5 litros) con batidor (de alambre).

Estabilidad de espuma:

La estabilidad de espuma se especifica porcentualmente, medida como el decremento de volumen de 100 ml de espuma en una hora tras una carga de una disolución de 5%, pH 7, durante 8 minutos a nivel 3 (591 rpm) en una procesadora de alimentos estándar de tipo Hobart 50N (caldera de acero de 5 litros) con batidor (de alambre).

Contenido de grasa:

El contenido de grasa se determina tras una extracción y saponificación de los ácidos grasos, por ejemplo, de acuerdo con el método de Caviezel (descrito en DGF. "Method of Caviezel", DGF KI 2c (00) In German Society for Fat Science eV, Münster DGF-Einheitsmethoden, 2nd edition Stuttgart: WVG, 2004).

A efectos comparativos, se utilizaron los siguientes productos fabricados disponibles comercialmente:

- Aislado de proteínas de guisante Pisane® (fabricado por Cosucra).
- Aislado de proteínas de soja SUPRO® EX33 (fabricado por DuPont).
- Caseinato de sodio (secado en polvo), FN5S de Rovita.

Con el procedimiento de producción de acuerdo con la invención es posible producir preparados de proteínas a partir de semillas de girasol con las siguientes propiedades:

Apariencia:

- En forma esparcida, por ejemplo como copos, granulados, polvos o de otro tipo de partículas.

El color es blanco hacia crema, gris claro o amarillo claro, opcionalmente con una proporción de partículas de color claro u oscuro de no más del 5% en peso, preferiblemente de menos del 2% en peso. El brillo L^* según la medida de color de CIE- $L^*a^*b^*$ tiene un valor de al menos 70, $L^* \geq 70$. Los siguientes son valores típicos de L^* , a^* y b^* :

$L^* \geq 80$, $-5 < a^* < +5$, $-5 < b^* < +20$;

preferiblemente

$L^* \geq 85, -3 < a^* < +3, -2 < b^* < +15;$

en particular preferiblemente

5 $L^* \geq 90, -1 < a^* < +1, 0 < b^* < +10.$

Composición:

10 - El contenido proteínico es menor que un 90% en la masa seca (TS), preferiblemente menor que un 80% basado en TS. Típicamente, el contenido proteínico está comprendido entre un 50 y 70% basado en TS.

- El contenido de fibra dietética total está comprendido entre un 10 y 40% basado en TS, preferiblemente entre un 10 y 30% basado en TS.

15 - El contenido de grasa, calculado, por ejemplo, mediante determinación gravimétrica tras la extracción Soxhlet, es menor de un 3% basado en TS, preferiblemente menor que un 1%.

- El contenido de azúcar total es inferior a un 15% basado en TS, preferiblemente menor que un 5%, más preferiblemente menor que un 2%.

20 - Contenido de sustancias no deseables, especialmente sustancias anti-nutricionales:

- El contenido de ácido fítico es menor que un 5% basado en TS, preferiblemente menor que un 2%, en particular preferiblemente menor que un 1%.

25 - El contenido de rafinosa es menor que un 5% basado en TS, preferiblemente menor que un 2,5%, en particular preferiblemente menor que un 0,5%.

30 - El contenido de ácido fenólico (determinado como ácido clorogénico) es inferior a un 5% basado en TS, preferiblemente inferior a un 2%, en particular preferiblemente menor que un 0,5%.

- El contenido de lignina es inferior a un 6% basado en TS, preferiblemente inferior a un 4%, en particular preferiblemente inferior a un 3%.

35 - En general, el contenido proteínico y de lignina en la harina de proteínas de girasol (SBPM) es menor que el concentrado de proteínas de girasol (SBPK) obtenido del mismo, mientras que el contenido de grasa, azúcares y ácidos fenólicos en la SBPM es mayor que el del SBPK.

Propiedades funcionales técnicas:

40 - Solubilidad proteínica:

La solubilidad proteínica, determinada según el método de determinación PNG, es mayor que un 30%, preferiblemente mayor que un 40%. Típicamente la solubilidad proteínica está en el intervalo de 30-60%.

45 - Retención de agua:

La retención de agua, determinada según el método de determinación AACC, es de al menos 1 ml/g, preferiblemente al menos 3 ml/g. Medidas comparativas muestran que la retención de agua del preparado es de al menos un 30% de la retención de agua de Pisane®, determinado según el método de determinación AACC.

50 Retención de aceite:

La retención de aceite, determinada según el método de determinación de retención de grasa, es de al menos 1 ml/g, preferiblemente al menos 4 ml/g. Medidas comparativas muestran que la retención de aceite es de al menos un 100% de la retención de aceite de Pisae® o de Supro® EX33, determinada según el mismo método.

- Capacidad emulsionante:

60 La capacidad emulsionante, determinada según el método de medición de conductividad, es de al menos 400 ml de aceite /g, preferiblemente al menos 500 ml de aceite /g. Medidas comparativas muestran que la capacidad emulsionante es al menos un 40% de la capacidad emulsionante del caseinato de sodio FN5S, determinado según el mismo procedimiento.

65 - Propiedades de formación de espuma:

- Actividad espumante:

5 La actividad espumante es de al menos 1000%. Medidas comparativas con claras frescas de huevo de gallina tras carga de 3 minutos a nivel 3 en una procesadora de alimentos estándar Hobart 50N con batidor muestran que la actividad espumante del preparado de proteínas es de al menos un 50% o incluso al menos un 60% de la actividad espumante de la clara de huevo de gallina.

- Densidad de espuma:

10 La densidad de espuma está en el intervalo entre 80 y 110 g/l. Medidas comparativas con claras batidas de huevo de gallina tras carga de 3 minutos a nivel 3 en una procesadora de alimentos estándar Hobart 50N con batidor muestran que la densidad de espuma está en el intervalo comprendido entre 80 y 110% de la densidad de espuma de la clara batida de huevo de gallina.

15 - Estabilidad de espuma:

20 La estabilidad de espuma es al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%. Típicamente se corresponde con al menos un 90% de la estabilidad de espuma de clara batida de huevo de gallina, medida como decremento de volumen de 100 ml de clara batida de huevo de gallina en una hora tras impacto de 3 minutos a nivel 3 en una procesadora de alimentos estándar Hobart 50N con batidor.

Propiedades sensoriales:

25 Además del color claro, el preparado de proteínas, en particular en la forma del SBPK, está sustancialmente libre de olores y tiene un sabor neutral. En particular, no presenta aromas de plantas o característicos de la siembra. En este sentido, sustancialmente no es perceptible ningún olor ni sabor a hierbas y alubias así como sustancialmente ningún sabor amargo.

30 Pruebas sensoriales en las que examinadores entrenados comparan un determinado sabor o impresión aromática del preparado de proteínas con una sustancia de referencia adecuada y lo valoran en una escala de 1 a 10 (1 = imperceptible, 10 = fuertemente perceptible), en los que la sustancia de referencia se selecciona de manera que el sabor o impresión aromática a probar sea valorada con al menos un 8, muestran que al preparado de proteínas se le asigna un valor de 3 o menos (típicamente un valor de 1).

35 Ejemplos de impresiones aromáticas o de sabor:

- sabor a alubia en comparación con alubias de soja;
- sabor a hierba o crudo en comparación con pimiento verde o guisantes verdes;
- sabor amargo en comparación con una disolución acuosa de cafeína al 0,1%.

40 El color, sabor y olor característicos del preparado de proteínas son tales que su incorporación en alimentos o comidas no produce sustancialmente ningún cambio significativo en la apariencia, olor y sabor característicos del producto terminado que sea apreciado como negativo, dicho cambio estimado con métodos estadísticos convencionales.

45 Pruebas sensoriales muestran que el cambio de sabor y aroma que se producen en un producto de alimentación al usar el preparado de proteínas se limita, en comparación al producto de alimentación sin el preparado de proteínas, en la medida en que un examinador entrenado puede reconocer una desviación de una de las anteriormente indicadas características de sabor o aroma en una escala de 1-10 en un máximo de 3 niveles, preferiblemente no más de 1 nivel (desviación casi indetectable).

50 En el procedimiento propuesto, la mayoría de las sustancias aromáticas propias de vegetales y otras sustancias secundarias de vegetales como ácidos fenólicos se separan mediante la utilización de alcohol mezclado con el agua propia de la siembra o de disoluciones de alcohol acuosas. Como resultado se obtienen harinas brillantes estables a la decoloración y prácticamente de olor y sabor neutro.

55 Sorprendentemente, el contenido proteínico de la harina refinada puede incrementarse de este modo mediante la extracción conjunta de otros componentes de peso molecular bajo, en particular los azúcares contenidos pueden aumentarse en una proporción mayor o igual al 60%, de manera que se obtienen concentrados de proteínas estables de alta calidad sin etapas de procedimiento adicionales.

60 Opcionalmente, en la fase de alcohol, acuosa o de agua-alcohol se obtiene una mezcla de azúcares/oligosacáridos y sustancias de vegetales secundarias como ácidos fenólicos. De modo particularmente ventajoso, los azúcares pueden servir de transportadores para las sustancias fenólicas, por ejemplo, en un secado subsiguiente para producir una forma de aplicación. Mediante absorción, cristalización o precipitación selectivas, las dos fracciones pueden purificarse o separarse adicionalmente de manera que ambas fracciones puedan utilizarse por separado.

Los inventores han detectado también que en una extracción con scCO₂ resultan ventajas especiales en el procesamiento de humedecimiento técnico adicional de los gránulos o harinas mediante el contenido reducido de sustancias acompañantes contaminantes, ya que el CO₂ contenido en el gránulo actúa al mismo tiempo de estabilizante en un procesado subsiguiente, al reducirse los procedimientos de oxidación.

Otra ventaja adicional se obtiene cuando los preparados obtenidos tras el tratamiento de scCO₂ son directamente empaquetados. Sorprendentemente, de este modo son protegidos de la oxidación directamente sin una nueva adición de gas de protección. De todas formas, una ventilación parcial o combinación con otros gases de protección puede ser ventajoso.

Además, se ha detectado que las propiedades funcionales de los preparados de proteínas se pueden modificar mediante el ajuste del tamaño de grano. Mediante una trituración fina apropiada o un fraccionamiento según el tamaño de grano o la densidad de grano de la harina de proteínas de girasol o del concentrado, la retención de agua así como la capacidad de emulsión puede ajustarse específicamente para cumplir diferentes requisitos. En este caso, resulta especialmente ventajoso ajustar un tamaño de grano de $\leq 500 \mu\text{m}$ o separar una fracción con un tamaño de grano $\leq 500 \mu\text{m}$.

Según el procedimiento de acuerdo con la invención, es posible producir preparados de proteínas de girasol de alta calidad con una utilización mínima de agua y que sorprendentemente tienen propiedades tan buenas como las de los aislados, aunque tengan un contenido inferior de proteínas. Con ayuda de la tecnología descrita, las semillas de girasol son fraccionadas casi completamente en alimentos de alta calidad nutricionales y técnico-funcionales y otras fracciones para uso energético y técnico, siendo el aprovechamiento de las proteínas especialmente alto.

De este modo, también se ha detectado que la disolución alcohólica resultante que contiene azúcar puede utilizarse directamente para la fermentación de bioetanol.

Los inventores han detectado además que el aceite que se obtiene por la extracción no polar y que contiene residuos de hexano es adecuado para su adición a, o la producción de, biodiesel o puede usarse directamente como combustible.

En otra realización ventajosa del procedimiento, las extracciones se configuran una detrás de la otra de manera que el alcohol residual retenido en el granulado se extrae al mismo tiempo que el CO₂ supercrítico, omitiéndose las subsiguientes etapas de destilación o purificación. Los inventores han determinado que el aceite que se obtiene mediante la extracción no polar y que contiene residuos de alcohol sorprendentemente es muy apropiado para ser procesado adicionalmente en biodiesel y que puede ser utilizado directamente en un procedimiento basado en el intercambio enzimático de esteres de grasa con alcohol. Por ello resulta especialmente ventajoso que cualquier componente de alcohol retirado eventualmente al aceite no sea retirado sino que permanezca contenido y se utilice en un procesamiento adicional del aceite en biodiesel después del procedimiento de intercambio de esteres.

Ejemplos de realización

Ejemplo 1: Concentrado de proteínas de semillas de girasol a partir de extracción alcohólica de semillas de girasol peladas y aceite exprimido

A semillas comestibles peladas y con una pureza de 99%, es decir con un contenido de cáscara $<1\%$ se les extrajo el aceite en una prensa de tornillo con una tobera de 5 mm de diámetro a una temperatura de aproximadamente 40°C (+5°C) hasta un contenido de grasa residual de 23% y a los compactos resultantes con forma de filamento se les extrajo el aceite en un Soxhlet durante 36 horas con n-hexano, siendo secados a temperatura ambiente para eliminar los residuos de hexano. El granulado obtenido de este modo a partir de semillas comestibles peladas, del que se extrajo el aceite y que contiene ácido fenólico, fue extraído con metanol (95%), la concentración de alcohol siendo incrementada por la extracción del agua desde un valor inicial de aproximadamente 85% (en volumen) hasta aproximadamente un 95%. La temperatura del baño de aceite fue de aproximadamente 85°C, la temperatura de extracción de entre 20°C (condensador) y un máximo de 65°C (temperatura de punto de ebullición de metanol = 65°C). Después de 12 repeticiones la extracción se detuvo, después de varias repeticiones ningún color amarillo del extracto era reconocible.

El concentrado de proteínas de girasol así obtenido es un polvo brillante fino que tiene un contenido proteínico de $> 60\%$. La composición se da en la siguiente tabla.

Nº	Designación de los ensayos	Masa seca (TS)	Proteína en TS	Grasa en TS (Büchi)	Ceniza en TS	Ácidos fenólicos en TS	Capacidad de emulsión
		%	%		%	%	ml/g
1	Harina de semillas de girasol (Granulado de semillas de girasol peladas)	90,4	61,1	3,6	7,5	0,50	510
2	Concentrado de proteínas de girasol (a partir de 1)	87,8	76,5	1,5	8,6	0,01	210
3	Aislado de proteínas de girasol (a partir de 2)	89,1	96,2	0,29	4,20	0,00	675

El concentrado de proteínas es pobre en componentes aromáticos característicos de plantas. El color de estas harinas y concentrados de proteínas de girasol de bajo contenido de cáscara es especialmente atractivo o neutral y se representa con los siguientes valores CIE L*a*b*:

5

Nº		L*	a*	b*
1	Harina de semillas de girasol	90,0	0,47	6,33
2	Concentrado de proteínas de girasol (a partir de 1)	86,8	0,18	8,11
3	Aislado de proteínas de girasol (a partir de 2)	73,9	1,22	10,94

La harina de girasol contenía previamente aproximadamente 0,5% de derivados de ácido cafeico, detectados por HPLC (detección electroquímica) y cuantificados mediante determinación fotométrica. La harina de girasol extraída, en adelante denominada concentrado de proteínas de girasol, contenía sólo trazas de ácido clorogénico, es decir en el límite inferior de detección de 0,01%. Consecuentemente se extrajeron 90% de los ácidos fenólicos, identificados y cuantificados como derivados de ácido cafeico. La cantidad extraída fue recuperada completamente en el extracto. La pérdida de masa seca (TS) fue de 24%. La masa seca extraída consistió en pequeñas cantidades de proteína, grasa y minerales. Además de ácidos fenólicos se obtuvieron principalmente azúcares, oligosacáridos, fibra, sumando en total un 63%, de los cuales oligosacáridos como rafinosa se extrajeron completamente un máximo de 30%. Sorprendentemente por tanto, otras sustancias secundarias vegetales, en particular ácido fítico, se presentaron en el extracto.

Los ácidos fenólicos fueron extraídos casi completamente del granulado y pudieron ser detectados en el extracto. El contenido mineral del granulado aumentó ligeramente como resultado del tratamiento con metanol mientras que las impurezas restantes se eliminaron. La extracción con metanol llevó a una eliminación considerable de las impurezas contaminantes, especialmente de los ácidos fenólicos y de sustancias de aceite acompañantes. El contenido de proteína se incrementó en más de 60%, de manera que pudo obtenerse un concentrado de proteínas estable al color o una extracción subsiguiente con humedecimiento técnico no se vio afectada por polifenoles (ver la tabla de colores del aislado de proteínas).

25

Ejemplo 2: Prensado de semillas de girasol peladas

A las semillas de girasol peladas se les exprimió el aceite con una prensa de tornillo a 40-50°C con 3 toberas diferentes, con un diámetro cada una de 6, 5 y 4 mm. Las tortas de prensado resultantes se diferenciaron en el contenido de grasa así como en su estructura y color (Tabla 2-1). El contenido de grasa se estimó de acuerdo con dos métodos: el método Büchi (según Caviezel), que especifica la grasa total, y el método Soxtherm, que determina el contenido extraíble.

30

Tabla 2-1

Designación de los ensayos	Masa seca (TS)	Proteína en TS	Grasa en TS (Büchi)	Grasa en TS (Soxtherm)
	%	%	%	%
Semillas de girasol peladas	94,7	25,2	55,9	52,2
Torta de prensado 1 / Tobera 6 mm	92,4	37,9	36,3	34,5
Torta de prensado 2 / Tobera 5 mm	92,3	37,9	35,3	33,4
Torta de prensado 3 / Tobera 4 mm	90,3	52,8	9,6	6,6

35

En el prensado con la tobera estrecha, la presión en la prensa aumentó significativamente, de manera que se consiguió una torta de prensado muy compacta con un contenido bajo en grasa de aproximadamente un 10%. Sin embargo, bajo estas condiciones la torta de prensado resultó más oscura, sugiriendo la presencia de oxidación o reacción de Maillard. En el prensado más suave, con una tobera más grande 5/6 mm, el contenido de grasa residual aumentó sustancialmente a aproximadamente un 33 ó 35%. Sin embargo, se pudo reducir hasta menos de un 1% mediante una extracción subsiguiente (Tabla 2-1).

40

La determinación de las propiedades funcionales mostró una mejora en la solubilidad proteínica y de la capacidad de emulsión en comparación con las semillas de partida de las dos últimas tortas de prensado, es decir consiguiendo una mejor rotura celular y una buena porosidad mediante el prensado. La porosidad se perdió a medida que se aumentó el grado de compactación. Para obtener una resistencia óptima de la torta de prensado con una buena estabilidad mecánica durante la extracción subsiguiente, el grado de compactación debió ser lo más alto posible.

Adicionalmente a la geometría de tobera, la temperatura de la prensa también tuvo un efecto en el grado de exprimición de aceite y la estructura del compacto. La resistencia de los compactos con sección transversal redonda se determinó mediante un analizador de textura (TA) bajo una compresión radial con una matriz de 75 mm de diámetro y una velocidad de desplazamiento de 1 mm/s. Se midió la fuerza máxima que se utilizó hasta la rotura del compacto. La fuerza se basó en la superficie en la superficie comprimida de 1 mm de anchura y la longitud del compacto bajo la matriz. El valor medio de cada presión de rotura se determinó con la ayuda de 20 ensayos.

Tabla 2-2

	Contenido de grasa	Valor medio de presión de rotura [N/mm ²]	Densidad aparente [Kg/m ³]
Tobera 5 mm, compactado a < 40°C	35%	0,58	310
Tobera 5 mm, compactado a < 40°C	23%	0,96	350
Tobera 5 mm, compactado a 55-60°C	17%	4,81	420
Tobera 8 mm, compactado a 60-70°C	11%	9,76	470

También se pudo conseguir un valor muy bajo de contenido de grasa residual de un 11% con una tobera más ancha de 8 mm de diámetro (Tabla 2-2) cuando la temperatura se aumentó hasta 70°C. Estos compactos presentaron una estabilidad mecánica muy alta pero con una densidad aparente alta y, por tanto, una porosidad más baja, también presentaron un color algo más oscuro que las tortas de prensado obtenidas a 40°C. Utilizando temperaturas más bajas, inferiores a 60°C, se pudo obtener un material bastante sólido con una porosidad significativamente mayor (Tabla 2-2) que presentó sólo pequeños daños térmicos y fue muy fácil de extraer. Por el contrario, a temperaturas > 70°C se presentaron daños en las proteínas significativos y una decoloración notable.

Se detectó que, con un grado de compactación hasta un contenido de grasa residual en el intervalo de aproximadamente 15% a 25% de grasa residual, se obtuvieron gránulos (pellets) de torta de prensado que a pesar de carecer de cáscaras presentaron una buena estabilidad mecánica con una porosidad suficiente, siendo posible en la extracción subsiguiente una exprimición de aceite completa. Sorprendentemente los gránulos presentan también una estabilidad mecánica suficiente incluso después de exprimir el aceite completamente a pesar del debilitamiento de la estructura asociado a la eliminación del aceite, de manera que pueden ser sometidos a una extracción adicional con otro disolvente y por tanto eliminar las sustancias que no son proteínas sin desintegrarse. Debido a su estructura porosa, tienen una respuesta a la extracción muy favorable para una extracción adicional, por ejemplo, mediante una disolución alcohólica. De este modo, es posible prescindir de una estructuración o trituración previa a la extracción, que si no normalmente se debe realizar.

Dependiendo de la configuración y geometría del dispositivo de prensado, el grado de compactación óptimo se logra con un contenido de aceite residual de aproximadamente 15% a 25% (ver figura 2). En este sentido se ha detectado que incluso a temperaturas inferiores a 60°C se logra una compactación suficiente de los compactos al tiempo que se mantiene óptimamente la funcionalidad y el color de las proteínas.

En general, mediante un prensado en el que un cierto contenido de grasa residual permanece, las partículas se estructuran de manera que no es necesaria una reestructuración o trituración posterior, lo que si no se realiza normalmente para romper la torta de prensado antes de la extracción. Además de la simplificación del procedimiento, esto contribuye a preservar la torta de prensado, de manera que la funcionalidad proteínica así como el color en el producto final pueden mejorarse.

Asimismo, mediante el grado de compactación reducido las proteínas son protegidas y las propiedades funcionales del preparado de proteínas se mantienen de forma mejorada. Al mismo tiempo, se produce una forma de partícula que hace posible una extracción óptima, por tanto pudiendo reducir adicionalmente el contenido de aceite residual después de exprimir el aceite. Esto también contribuye, entre otros efectos, a mejorar el color del preparado de proteínas.

Ejemplo 3: Harinas de semillas de girasol y concentrados de proteínas obtenidos mediante exprimición de aceite y extracción de torta de prensado sin cáscaras con hexano, scCO₂ y etanol

Producción:

1. Pelado de las semillas de girasol y separación en una fracción de cáscara y una fracción de núcleo y utilización de la fracción de núcleo con un contenido de cáscara de 0,5% (en peso) como máximo.

2. Exprimición parcial de aceite por medios mecánicos hasta un contenido de grasa residual de aproximadamente 36% mediante prensado, como en el ejemplo 2.
- 5 3. Exprimición de aceite de la torta de prensado de girasol a) con iso-hexano en un percolador a una temperatura máxima de 60°C o b) extracción con CO₂ supercrítico en un contenedor a presión (ver ajustes en la tabla posterior).
4. Extracción de la torta de prensado a partir de 2 o de la harina de proteínas a partir de 3a con etanol y/o hexano en un aparato de Soxhlet (ver ajustes en la tabla posterior).
- 10 5. Expulsión del hexano después de la extracción 3a con vapor de hexano sobrecalentado en vacío (< 500 hPa).
6. Expulsión de hexano adicional a partir de 5 con vapor de agua sobrecalentado en vacío (< 500 hPa).
- 15 7. Retirada de residuos de disolvente a partir de 6 mediante calentamiento a 60°C en vacío (< 500 hPa). El refinado así obtenido se denomina en adelante harina de proteínas.
8. Retirada del disolvente según las extracciones 4 en una corriente de aire a temperatura ambiente para obtener concentrados de proteínas.
- 20 9. Evaporación del alcohol y secado del refinado obtenido en la etapa 8 del procedimiento, en un evaporador rotatorio en vacío a una temperatura máxima de 50°C, para obtener un concentrado de proteínas de girasol.
- 25 10. Molienda de la harina de proteínas de girasol y el concentrado a partir de la etapa 3b, 7 ó 9 en un molino de púas con un elemento de tamiz de 0,5 mm, para obtener los preparados de proteínas como un polvo fino.
11. Utilización de las harinas de proteínas y los concentrados de proteínas con o sin, anterior o subsiguiente, trituración.
- 30 Los granulados a partir de la prensa de tornillo (5 mm de tobera, del ejemplo 2) fueron a continuación exprimidos de aceite de dos formas diferentes, 1. Con hexano (exprimición de aceite y eliminación de disolvente a temperaturas inferiores a 60°C) y 2. Con CO₂ supercrítico. Con esto se consiguió exprimir el aceite completamente con hexano, la extracción con CO₂ a 800*10⁵ Pa fue también casi completa, a 285*10⁵ Pa fue sin embargo un 20% menor la cantidad de aceite extraída (50°C, 100 Kg/ Kg de CO₂). El examen del número de ácidos de los aceites de ambos procedimientos de extracción no dio diferencias fundamentalmente. Se observó también que los granulados son muy adecuados para la extracción sin trituración o tratamiento adicionales.
- 35

Tabla 3-1

Nº	Designación de los ensayos y producción	Masa seca (TS)	Proteína en TS (Nx6,25)	Grasa en TS (Büchi)	Ceniza en TS	EC
		%	%	%	%	
1	Torta de prensado	92,3	42,3	35,3	4,6	505
2	Harina de semillas de girasol/exprimida de aceite con hexano/< 60°C	90,8	63,6	3,0	7,7	510
3	Harina de semillas de girasol/extraída con scCO ₂ /50°C, 285*10 ⁵ Pa (a partir de 1)	94,2	58,6	10,7	6,7	598
4	Harina de semillas de girasol/extraída con scCO ₂ /50°C, 800*10 ⁵ Pa (a partir de 1)	93,6	62,7	3,8	7,7	513
5	Concentrado de proteínas de semillas de girasol/extraído con etanol (a partir de 1)	92,4	58,9	15,7	6,9	280
6	Concentrado de proteínas de semillas de girasol/extraído con etanol (a partir de 2)	90,9	69,0	0,4	8,4	380
7	Concentrado de proteínas de semillas de girasol/extraído con etanol y exprimido de aceite con hexano, transición fluida (a partir de 5)	90,4	70,3	0,3	8,4	285
8	Concentrado de proteínas de semillas de girasol/extraído con etanol, secado y a continuación exprimido de aceite con hexano (a partir de 5)	90,3	69,0	0,2	8,2	285

Propiedades:

- 5 Las harinas y concentrados de proteínas de girasol obtenidos de este modo tienen un contenido proteínico de al menos un 50% (N x 5,6) y una composición adicional así como propiedades funcionales como se especifican en la tabla siguiente. Los concentrados de proteínas de girasol (Nº 6-8) están libres de componentes aromáticos propios de girasol. La harina (Nº 2) retuvo cierto sabor característico a frutos secos de girasol. Después de un simple filtro y cribado (< 263 mm) se utilizó para la emulsión de una mayonesa de ensalada sin huevo, que resultó comparable en homogeneidad y estabilidad a un aislado de proteínas vegetal y con buenas propiedades sensoriales.
- 10 El color de la harina de proteínas de girasol sin cáscaras y de los concentrados de proteínas de girasol es especialmente atractivo, es decir neutral y comprende los siguientes valores CIE-L*a*b*:

Tabla 3-2

Nº	Designación de los ensayos y de los mismos preparados de la tabla 3-1	L*	a*	b*
1	Torta de prensado	70,5	1,95	12,75
2	Harina de semillas de girasol exprimida con hexano < 60°C (a partir de 1)	89,21	0,59	6,48
3	Harina de semillas de girasol extraída con scCO ₂ 50°C, 285*10 ⁵ Pa (a partir de 1)	88,4	0,49	7,49
4	Harina de semillas de girasol extraída con scCO ₂ 50°C, 800*10 ⁵ Pa (a partir de 1)	89,3	0,31	6,79
5	Concentrado de proteínas de semillas de girasol extraído con etanol (a partir de 2)	88,0	-0,0	+7,8

15 **Ejemplo 4: Harinas de proteínas de semillas de girasol a partir de semillas de girasol peladas con aceite exprimido que presentan propiedades modificadas mediante ajuste del tamaño de grano**

En este ejemplo se investigó, entre otros aspectos, la modificación de las propiedades funcionales de los preparados de proteínas de girasol mediante un tratamiento final del tamaño de grano.

20 Producción:

1. Pelado de las semillas de girasol y separación en una fracción de núcleo y una fracción de cáscara.
- 25 2. Exprimición parcial mecánica hasta un contenido residual de grasa de aproximadamente un 36% mediante prensado, ver el ejemplo 2.
3. Exprimición de aceite de la torta de prensado de girasol con iso-hexano en un percolador a una temperatura máxima de 60°C.
- 30 4. Expulsión del hexano mediante vapor de hexano sobrecalentado en vacío (< 500 hPa).
5. Expulsión de hexano adicional con vapor de agua sobrecalentado en vacío (< 500 hPa).
- 35 6. Eliminación de residuos de disolvente mediante calentamiento a 60°C en vacío (< 500 hPa). El refinado obtenido de este modo se denomina en adelante harina de proteínas.
7. Clasificación, cribado y/o molienda del concentrado de proteínas en un molino de púas o de impacto para obtener fracciones con diferente distribución de tamaño de partículas y de este modo modificar las propiedades funcionales.
- 40 8. Utilización de las harinas de proteínas y de los concentrados de proteínas con o sin, anterior o subsiguiente, trituración.

45 La harina con aceite exprimido (Nº 2) sólo se cribó (< 263mm) y se utilizó directamente para la emulsión de una mayonesa de ensalada sin huevo, que resultó comparable en homogeneidad y estabilidad a un aislado de proteínas vegetal. El sabor y textura pudieron ser mejorados adicionalmente cuando la harina de proteínas fue molida.

50 Mediante un tratamiento del tamaño de grano como se realizó anteriormente en la última etapa 7, se pudieron modificar las propiedades funcionales de los preparados de proteínas de semillas de girasol. Para la reducción del tamaño de grano, además de una molienda simple también se utilizó una clasificación o cribado, opcionalmente en conjunción con una trituración. Con el decremento del tamaño de grano, la retención de agua tendió a incrementarse, igualmente la capacidad de emulsión en el SBK, mientras que la retención de aceite disminuyó ligeramente o apenas cambió. Los preparados con una distribución de tamaño de partícula más homogénea presentan una retención de agua más alta. La combinación del fraccionamiento con la trituración resultó ser

especialmente ventajosa para incrementar la retención de agua. En general, es posible modificar el perfil funcional mediante un tratamiento específico de la distribución del tamaño de partícula.

Las características del procedimiento de las reivindicaciones 1 ó 2 pueden combinarse con:

- 5
- Un procedimiento en el que la temperatura de las semillas de girasol peladas en una exprimición parcial de aceite y una exprimición de aceite adicional se mantiene en un intervalo de entre 10°C y 80°C, preferiblemente a $\leq 70^\circ\text{C}$, más preferiblemente a $\leq 60^\circ\text{C}$.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener preparados de proteínas a partir de semillas de girasol que comprende al menos las siguientes etapas:
- 5 - Pelar las semillas de girasol hasta que tengan un contenido de cáscara residual $\leq 5\%$ en peso o proporcionar semillas de girasol peladas que tengan un contenido de cáscara residual $\leq 5\%$ en peso,
 - Exprimir parcialmente el aceite de las semillas de girasol peladas por medios mecánicos de prensado,
 - Realizar una o varias etapas de extracción con al menos un disolvente para obtener una harina con contenido proteínico y sin grasa como preparado de proteínas, produciéndose en al menos una de las etapas de extracción
 10 una exprimición adicional de aceite de las semillas de girasol peladas y con aceite parcialmente exprimido,
 - tal que la exprimición parcial de aceite por medios mecánicos se realiza hasta un contenido de grasa o aceite en las semillas de girasol peladas en el intervalo de entre un 10 a 35% en peso, obteniendo una torta de prensado en la forma de gránulos o filamentos que tiene un espesor en el intervalo de entre 0,2 y 4 cm, y
 - tal que la al menos una etapa de extracción se realiza en la torta de prensado en la forma de gránulos o filamentos.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la exprimición parcial de aceite se realiza hasta un contenido de grasa o aceite en las semillas de girasol peladas en el intervalo de entre un 12 y 25% en peso, preferiblemente entre un 17 y 25%, y/o en el que la exprimición parcial de aceite produce tortas de prensado que tienen forma de filamentos con una sección transversal aproximadamente redonda y un diámetro entre 0,4 y 4 cm, preferiblemente en el intervalo de entre 0,5 y 2 cm, o una sección transversal angulada con una longitud de lado de entre 0,4 y 4 cm, preferiblemente en el intervalo de entre 0,5 y 2 cm, en al menos una dimensión, y que tienen una resistencia a rotura de 2-10 N/mm², preferiblemente de 4-8 N/mm².
- 20 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que la temperatura de las semillas de girasol peladas en la exprimición parcial y adicional de aceite se mantiene en el intervalo entre 10°C y 80°C, preferiblemente en $\leq 70^\circ\text{C}$, más preferiblemente en $\leq 60^\circ\text{C}$.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la exprimición parcial de aceite y la una o varias etapas de extracción se realizan de manera que el grado de desnaturalización de las proteínas en la harina con contenido proteínico y sin grasa es como máximo un 40%, preferiblemente entre un 10% y 30%.
- 30 5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que las varias etapas de extracción comprenden una combinación de al menos una etapa de extracción lipofílica con un disolvente lipofílico y al menos una etapa de extracción hidrofílica con un disolvente hidrofílico.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que sustancias sin proteínas se retiran de la harina con contenido proteínico y la mayoría de las proteínas (es decir con una pérdida de proteína de un 10% como máximo) permanecen no disueltas mediante la etapa de extracción hidrofílica, siendo utilizado como disolvente un disolvente acuoso alcohólico con una proporción de alcohol entre 600 y 800 mililitros de alcohol por litro de disolvente.
- 40 7. Procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que se realizan varias etapas de extracción hidrofílica con un disolvente que contiene alcohol, el contenido de alcohol en el disolvente que contiene alcohol siendo incrementado en al menos una transición entre una etapa de extracción hidrofílica y la siguiente.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el contenido de agua residual después de la primera etapa de extracción hidrofílica es de un 20-30% y se reduce a un 5-10% mediante una extracción adicional con un disolvente hidrofílico.
- 50 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la realización de la etapa de extracción se efectúa con hexano como disolvente.
- 55 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la realización de la etapa de extracción se efectúa con scCO₂ como disolvente.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la harina con contenido proteínico se modifica en el tamaño de grano o se separa según el tamaño o espesor de grano para cambiar propiedades funcionales de la harina con contenido proteínico.
- 60 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el tamaño de grano de la harina con contenido proteínico se ajusta a $\leq 500 \mu\text{m}$.
- 65

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que los disolventes que resultan en el residuo de extracción se separa por aplicación de vacío a temperaturas menores de 70°C, preferiblemente en vacío de 200-800 hPa y una temperatura de 40-65°C.

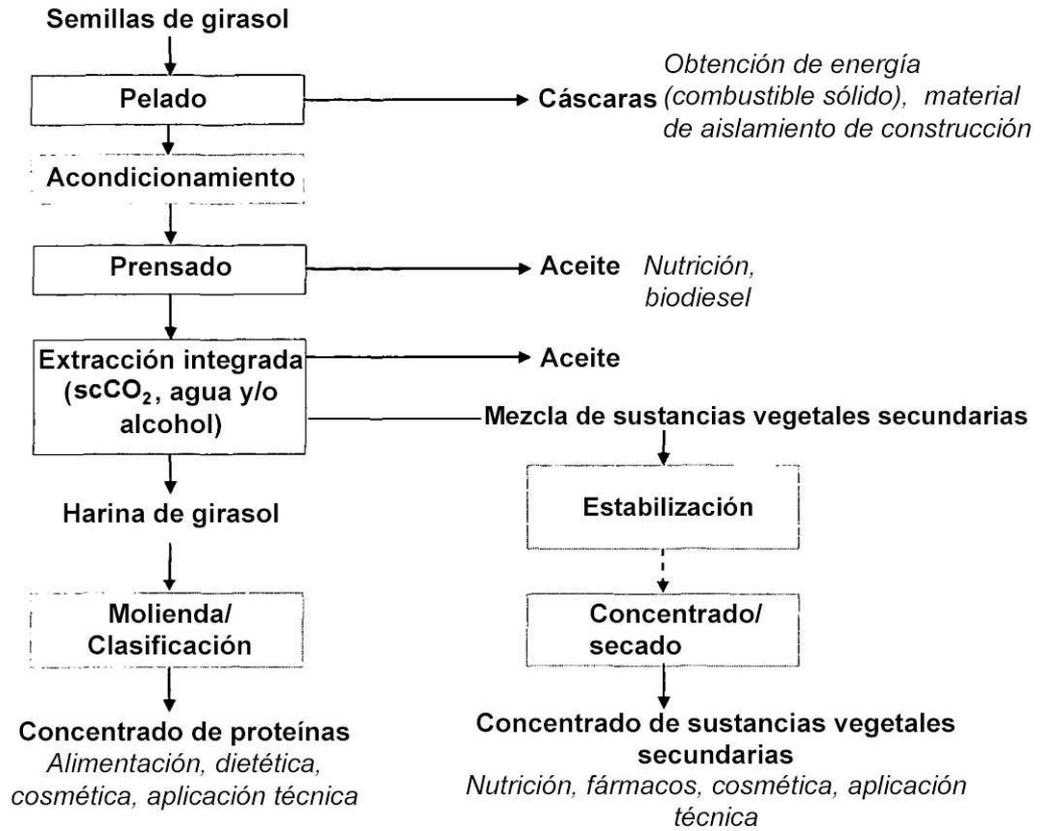


Fig. 1

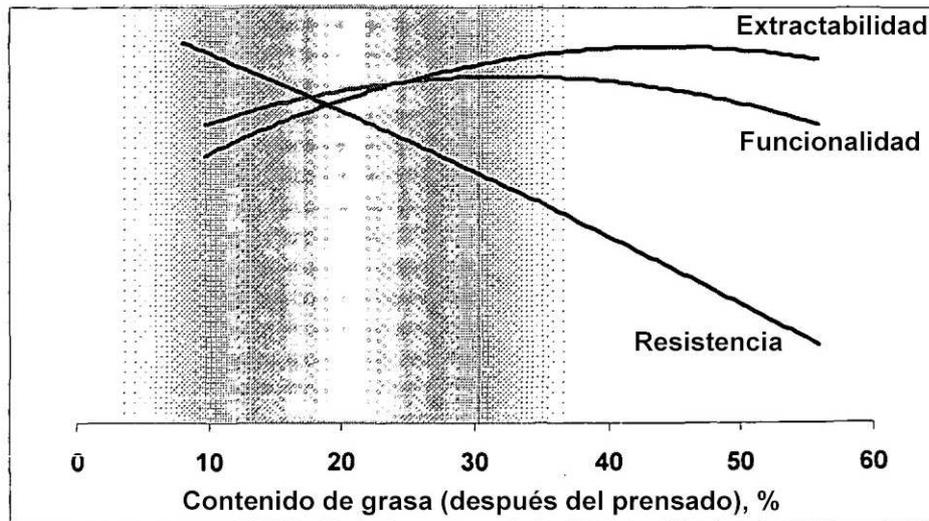


Fig. 2

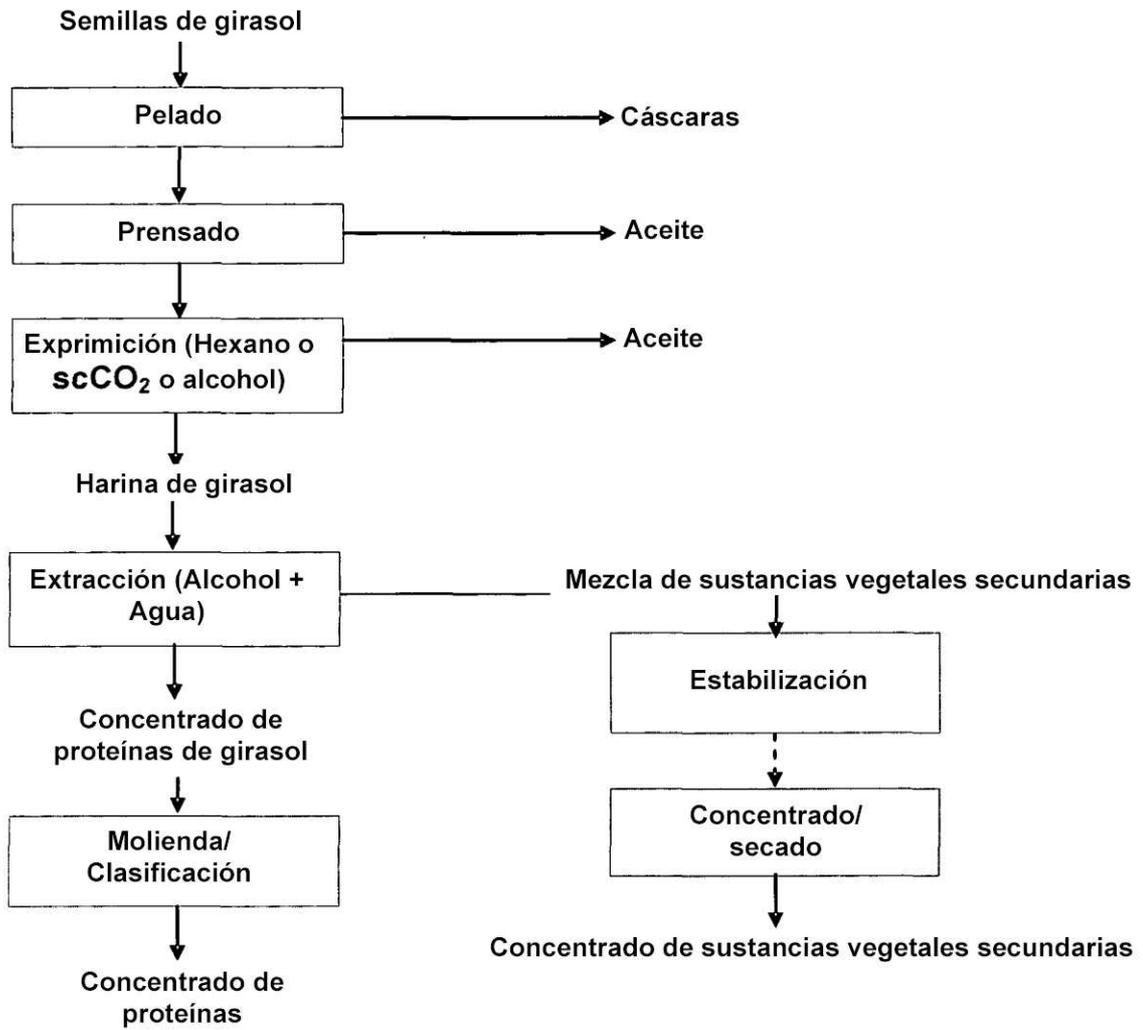


Fig. 3