

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIÉTÉ (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 33752 B1**
(43) Date de publication : **01.11.2012**
(51) Cl. internationale : **C12P 21/00; C12P 7/64;
C12P 19/14; A23D 9/02;
A23J 1/14; C07K 1/14;
C11B 1/02; C13K 1/02;
C13K 13/00; C13B 20/00**

(21) N° Dépôt : **34870**
(22) Date de Dépôt : **15.05.2012**
(30) Données de Priorité : **16.10.2009 FR 0957274**
(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT : **PCT/EP2010/065447 14.10.2010**
(71) Demandeur(s) : **UNIVERSITE DE LORRAINE, 34 cours Léopold CS 25233 F-54052 Nancy Cedex (FR)**
(72) Inventeur(s) : **MUNIGLIA, Lionel ; GIRARDIN, Michel ; PIFFAUT, Bernadette ; RICOCHON, Guillaume**
(74) Mandataire : **SMAS INTELLECTUAL PROPERTY**

(54) Titre : **PROCEDE D'EXTRACTION ENZYMATIQUE EN MILIEU AQUEUX D'HUILES ET DE PROTÉINES A PARTIR DE MATIÈRE VÉGÉTALE**

(57) Abrégé : Procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprenant les étapes suivantes : a) addition d'eau à de la matière végétale, b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0.14, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins 7.10

Abrégé**Procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles et de protéines à partir de matière végétale**

- 5 L'invention concerne un procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprenant les étapes suivantes :
- 10 a) addition d'eau à de la matière végétale présentant une taille de particule appropriée,
- 15 b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0.14, de préférence compris entre 0.35 et 0.45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins $7 \cdot 10^{-3}$, de préférence compris entre $1 \cdot 10^{-2}$ et $2 \cdot 10^{-2}$, l'activité de la pectinase étant inférieure à $120 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, et de préférence inférieure à $100 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 20 c) incubation sous agitation de la matière végétale et du mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réactionnel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles, pendant une durée dépendant des rendements recherchés,
- 25 d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile libre, une phase aqueuse contenant des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide,
- e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion dans le milieu réactionnel,
- f) séparation des protéines et des sucres fermentescibles de la phase aqueuse.
- 30

01 NOV 2012

Description**Procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles et de protéines à partir de matière végétale****Domaine technique**

- 5 [0001] La présente invention concerne un procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines, et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale.

Etat de la technique

- 10 [0002] Les procédés traditionnels d'extraction d'huiles font intervenir des solvants organiques, comme l'hexane. L'utilisation de ces solvants entraîne de nombreux problèmes de sécurité des installations et des personnels, de santé humaine et de préservation de l'environnement. On recherche en effet à réduire les émissions de composés organiques volatiles (COV).

- 15 [0003] Depuis une trentaine d'années, plusieurs équipes de recherche dans le monde travaillent à la mise au point de procédés « propres » pour l'extraction de graines d'oléagineux. Ces procédés sont fondés sur une extraction des huiles par voie aqueuse associant enzymes et catalyseurs biologiques. Ces procédés, bien que se voulant écologiques, prévoient d'utiliser malgré tout un solvant ou prévoient une
- 20 étape de correction du pH par des composés alcalins ou acides. Ces procédés n'ont pas été validés à l'échelle industrielle car les catalyseurs utilisés ne permettraient pas de bons rendements à une telle échelle.

- 25 [0004] La présente invention a pour but de proposer un nouveau procédé d'extraction d'huiles à partir d'une matière végétale, exempt des inconvénients énumérés ci-dessus. Plus particulièrement, la présente invention a pour but de proposer un procédé d'extraction des huiles végétales permettant de supprimer l'emploi de tous les solvants organiques et d'obtenir un procédé propre permettant d'extraire des
- 30 huiles, des protéines et d'autres co-produits de hautes qualités nutritionnelles.

- [0005] La présente invention a également pour but de proposer un procédé pouvant être mis en œuvre au niveau industriel avec des rendements intéressants.

- 35 [0006] La présente invention a également pour but de proposer un procédé permettant d'utiliser tous les produits extraits issus du procédé.

Divulgation de l'invention

- 40 [0007] A cet effet, la présente invention concerne un procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprenant les étapes suivantes :

- a) addition d'eau à de la matière végétale présentant une taille de particule appropriée,
- 45 b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0.14, de préférence compris entre 0.3 et 2.5, et plus préférentiellement entre 0.35 et 0.45, et le rapport entre

- l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins 7.10^{-3} ; de préférence compris entre 1.10^{-2} et 0.5, et plus préférentiellement entre 1.10^{-2} et 2.10^{-2} , l'activité de la pectinase étant inférieure à $120 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, et de préférence inférieure à $100 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 5
- c) incubation sous agitation de la matière végétale et du mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réactionnel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles, pendant une durée dépendant des rendements recherchés,
- 10
- d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile libre, une phase aqueuse contenant des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide,
- e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion dans le milieu réactionnel,
- 15
- f) séparation des protéines et des sucres fermentescibles de la phase aqueuse.
- [0008] La présente invention concerne également l'utilisation, dans un procédé tel que défini ci-dessus, d'un mélange enzymatique tel que défini ci-dessus, pour supprimer toute étape de correction du pH dans ledit procédé.
- 20
- Mode(s) de réalisation de l'invention**
- [0009] Selon l'invention, le procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprend les étapes suivantes :
- 25
- a) addition d'eau à de la matière végétale présentant une taille de particule appropriée,
- b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0.14, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins 7.10^{-3} , l'activité de la pectinase étant non nulle et inférieure à $120 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 30
- c) incubation sous agitation de la matière végétale et du mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réactionnel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles, pendant une durée dépendant des rendements recherchés,
- 35
- d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile libre, une phase aqueuse contenant des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide,
- 40
- e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion dans le milieu réactionnel,
- f) séparation des protéines et/ou des sucres fermentescibles de la phase aqueuse, en fonction des produits que l'on souhaite récupérer.
- 45
- [0010] En ce qui concerne l'étape a), la taille de particule appropriée de la matière végétale est avantageusement obtenue par broyage de ladite

- matière végétale. Le broyage doit être le plus fin possible pour favoriser l'action des enzymes. Idéalement, toutes les particules doivent avoir une taille proche de 50 μm , de préférence proche de 10 μm .
- 5 [0011] Avantagement, le volume d'eau est minimisé de façon à réduire les effluents à traiter et concentrer les produits extraits. De préférence, la masse d'eau ajoutée à la matière végétale est égale à 1 à 2 fois la masse de ladite matière végétale et ne dépasse pas cette quantité.
- 10 [0012] De préférence, le procédé selon l'invention comprend en outre, après l'étape a), une étape de désactivation des enzymes endogènes du mélange eau/matière végétale. Cette désactivation se fait de préférence par la chaleur. Le mélange eau/matière végétale est chauffé à une température comprise entre 80°C et 105°C pendant 5 à 20 min. La température est ensuite ramenée à la température utilisée pour l'étape b).
- 15 [0013] En ce qui concerne l'étape b), le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase est de préférence compris entre 0.3 et 2.5, et plus préférentiellement entre 0.35 et 0.45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase est de préférence compris entre $1 \cdot 10^{-2}$ et 0.5, et plus préférentiellement entre $1 \cdot 10^{-2}$ et $2 \cdot 10^{-2}$, l'activité de la pectinase étant de préférence inférieure à 100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{m}$.
- 20 [0014] Plus particulièrement, le mélange enzymatique utilisé contient les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :
- 25 - cellulases :
 - betaglucosidase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 4.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - endocellulase : entre 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 27 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 30 - exocellulase : entre 0 et 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 25.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - hemicellulases :
 - 35 - arabinanase : entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 465 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1335 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - xylanase : entre 0 et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1700 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - galactanase : entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 750 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - pectinases :
 - 40 - endopolygalacturonase : entre 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 61 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - pectine méthylestérase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.
- 45 [0015] Ces enzymes sont disponibles dans le commerce.
- [0016] Dans le cas particulier où la matière végétale est le colza, le mélange enzymatique utilisé peut contenir les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :

- cellulases :
 - betaglucosidase : entre 3 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - endocellulase : entre 110 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 130 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - exocellulase : entre 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 5 - hemicellulases :
 - arabinanase : entre 1200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1500 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - xylanase : entre 1500 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - galactanase : entre 800 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 10 - pectinases :
 - endopolygalacturonase : entre 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 70 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - pectine méthylestérase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.
- 15 [0017] Dans le cas particulier où la matière végétale est le tournesol, le mélange enzymatique utilisé peut contenir les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :
 - cellulases :
 - betaglucosidase : entre 11 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 14 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - endocellulase : entre 25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 35 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - exocellulase : entre 8 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 12 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - hemicellulases :
 - arabinanase : entre 450 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 550 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - xylanase : entre 0 et 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - galactanase : entre 700 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 900 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - pectinases :
 - endopolygalacturonase : entre 75 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 95 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - pectine méthylestérase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.
- 20
- 25
- 30 [0018] De préférence, la quantité utilisée du mélange enzymatique tel que défini ci-dessus est comprise entre 0.25% et 10%, de préférence entre 1% et 6%, en volume du mélange eau/matière végétale.
- 35 [0019] De plus, le mélange enzymatique peut également comprendre une phénolate estérase, de préférence une férulate estérase, dont l'activité est comprise entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence comprise entre 4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, et de préférence comprise entre 7.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ dans le cas particulier du colza et entre 4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ dans le cas particulier du tournesol.
- 40 [0020] Avantagement, l'incubation selon l'étape c) est réalisée pendant 2 à 20 heures, de préférence entre 4 et 12 heures, à une température comprise entre 25°C et 75°C, de préférence entre 40°C et 60°C, et de préférence autour de 50°C.
- 45 [0021] D'une manière avantageuse, aucune étape de correction du pH n'est prévue, en particulier lorsque la matière végétale traitée est du colza ou du tournesol.

- [0022] Le pH du milieu réactionnel doit être compris entre 5.5 et 4.5, et de préférence compris entre 4.8 et 5.
- 5 [0023] Cependant, il peut être nécessaire dans certains cas de corriger le pH pour correspondre au pH optimum des enzymes. Dans ce cas, on peut utiliser des acides tels que l'acide acétique (E 260) ou l'acide citrique (E 330).
- 10 [0024] L'agitation prévue à l'étape c) est réalisée de préférence au moyen d'un mélangeur comprenant des pales plates favorisant le mélange et limitant le cisaillement. L'agitation doit être suffisante pour assurer le transfert de chaleur mais minimisée pour éviter l'apparition d'émulsion.
- 15 [0025] La durée d'incubation est adaptée en fonction de la quantité des produits extraits souhaitée. En effet, du temps d'hydrolyse va dépendre la libération en huiles, en sucres et en protéines. La majorité des protéines se solubilise très rapidement, par exemple en moins d'une heure. Le rendement en huiles se stabilise entre 4 et 6 heures, puis il continue de progresser plus lentement. Les concentrations en sucres fermentescibles augmentent régulièrement jusqu'à 12 heures, et au-delà.
- 20 [0026] La réaction d'hydrolyse est ensuite stoppée par désactivation des enzymes par chauffage de préférence entre 80°C et 105°C pendant par exemple 5 à 20 minutes.
- 25 [0027] Puis le milieu réactionnel est séparé, selon l'étape d), en utilisant toutes les techniques de séparation connues adaptées, telle que la centrifugation ou la décantation. Idéalement cette séparation s'effectue sous 3000 g pendant 5 minutes à 80°C.
- 30 [0028] D'une manière avantageuse, la séparation des produits extraits est réalisée au moyen d'un tricanteur. Un tel appareil est un décanteur centrifuge horizontal pour la séparation continue du milieu réactionnel en trois phases : l'huile libre, une phase aqueuse contenant une partie des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide constituée par des tourteaux partiellement déshuilés. Le tricanteur permet le recyclage des matières et la gestion de temps d'hydrolyse différents en fonction des produits que l'on souhaite récupérer.
- 35 [0029] En fonction de la matière végétale dont on veut extraire les huiles, de l'émulsion peut se former dans la phase huileuse ou dans la phase aqueuse.
- [0030] Le mélange enzymatique utilisé dans l'invention permet de limiter la quantité d'émulsion, en particulier pour le tournesol.
- 40 [0031] Lorsqu'il se forme de l'émulsion, celle-ci est séparée de la phase avec laquelle elle a été recueillie par exemple au moyen d'un décanteur. L'émulsion peut être recyclée et réinjectée dans le tricanteur afin de subir une nouvelle hydrolyse pour libérer les huiles qu'elle renferme.
- 45 [0032] Dans le tableau I ci-dessous sont indiquées les quantités de produits obtenus à partir de 10 kg de graines (à 50% d'huile) mélangées à 10 kg d'eau, traités selon le procédé de l'invention:

Tableau I

Produits	Quantité à partir de 10 kg de graines et 10 kg d'eau
Huile	4 à 4.7 kg
Phase aqueuse et l'émulsion	11 à 15 kg
Dont sucres	60 à 100 g/l de phase aqueuse
Dont protéines	25 à 35 g/l de phase aqueuse
Tourteaux (le reste de graines)	2-4 kg

- 5 [0033] L'huile libre récupérée est immédiatement stockée sous avec un gaz inerte, tel que l'azote, en attendant son raffinage si nécessaire. Elle contient une grande proportion de tocophérols. Ces antioxydants recherchés sont classiquement entraînés lors de l'étape de désodorisation. Leur présence en grand nombre dans les huiles extraites selon le procédé de l'invention, fait qu'ils sont en partie préservés lors de l'étape de désodorisation.
- 10 [0034] Les tourteaux sont séchés et stockés ou recyclés pour subir une seconde hydrolyse. Ils peuvent être utilisés pour l'alimentation animale.
- [0035] Les sucres fermentescibles et les protéines contenus dans la phase aqueuse sont séparés par tout moyen le permettant, notamment par des techniques de filtrations (nano-ultrafiltration), ou par des techniques de précipitation.
- 15 [0036] Les sucres fermentescibles de la phase aqueuse subissent une fermentation par des micro-organismes (bactéries, levures, champignons) adaptés tels que *Saccharomyces cerevisiae*, pour produire de l'éthanol, que l'on peut utiliser comme biocarburant.
- 20 [0037] Les protéines sont extraites de manière importante, les rendements d'extraction étant environ 10 fois supérieurs aux procédés traditionnels d'extraction. Les protéines sont de très bonnes qualités, très peu dénaturées.
- [0038] Ainsi, tous les produits extraits peuvent être valorisés.
- 25 [0039] De préférence, le procédé selon l'invention est mis en œuvre avec de la matière végétale choisie parmi le groupe comprenant les tourteaux gras issus de la première pression et les graines d'oléagineux.
- [0040] Les oléagineux sont choisis de préférence parmi le groupe comprenant le colza et le tournesol. Le procédé selon l'invention peut aussi être appliqué à des fruits oléagineux, tels que les olives.
- 30 [0041] Les exemples suivants illustrent la présente invention sans toutefois en limiter la portée.
- [0042] Exemples
- 35 [0043] Exemples 1 à 5
- [0044] 750 grammes de graines de tournesol sont broyées dans un broyeur à couteau pendant 1min30 (3 fois 30 secondes). Le volume d'eau distillé nécessaire est ajouté au broyat, mélangé et mis à bouillir dans un four à micro-ondes afin de désactiver les enzymes endogènes. Le chauffage est arrêté lorsque l'ébullition commence. Parallèlement, le mélange enzymatique est réalisé dans un bécher. Afin d'éviter un choc
- 40

- thermique, les enzymes étant stockées à 4°C, le bécher est plongé dans un bain-marie à température ambiante. Le bain-marie est alors mis en marche avec une température de consigne de 50°C pour que les enzymes subissent une montée en température graduelle. Les graines
- 5 broyées sont versées dans un fermenteur de 2L et la régulation de température et l'agitation sont mises en marche. Lorsque le milieu atteint 50°C, le mélange enzymatique est ajouté et la réaction d'hydrolyse débute. Le pH est proche du pH optimum des enzymes et ne nécessite pas de correction. Au bout de 4 heures, le milieu
- 10 réactionnel est séparé au moyen d'une centrifugeuse à 9000 g pendant 15 min à 20°C. On récupère les différentes phases.
- [0045] Pour les exemples 1, 3 et 4, l'émulsion séparée de la phase aqueuse n'est pas recyclée.
- [0046] Pour l'exemple 2, l'émulsion séparée de la phase aqueuse est recyclée.
- 15 [0047] On mesure le pourcentage massique d'huile contenue dans chaque fraction extraite (huile libre, phase aqueuse + émulsion, phase solide) par rapport à la totalité des huiles recueillies dans les trois fractions (huile libre / phase aqueuse + émulsion / phase solide), sans recyclage de l'émulsion et avec recyclage de l'émulsion.
- 20 [0048] A titre d'exemple comparatif, un lot de graines est traité de la même manière mais sans enzyme (Exemple 5 comparatif).
- [0049] Les résultats sont indiqués dans le tableau II suivant :

25

Tableau II

	Ex. 1 (inv.)	Ex. 2 (inv.)	Ex. 3 (inv.)	Ex. 4 (inv.)	Ex.5 (comp.)
Temps (h)	4	4 + recycl.	12	4	4
Température (°C)	50	50	50	50	50
Agitation (rpm)	340	340	340	340	450
pH	5.2	5.1	4.9	5.1	5.5
Rapport graines/eau	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Rapport enzyme/graine	0.05	0.05	0.05	0.05	0
betaglucosidase ^a	12.7	12.7	12.7	20.2	0
endocellulase ^a	27.1	27.1	27.1	10.3	0
exocellulase ^a	9.4	9.4	9.4	0.7	0
arabinanase ^a	468.6	468.6	468.6	3.4	0
xylanase ^a	8.4	8.4	8.4	0	0
Galactanase ^a	775.8	775.8	775.8	153	0
endopolygalacturonase ^a	85.1	85.1	85.1	76.9	0
pectine méthylestérase ^a	1.8	1.8	1.8	1.7	0
Férulate estérase ^a	3.8	3.8	3.8	4.2	0
Masse d'huile libre (g)	270.3	335.7	329.4	278.7	127.9
Masse huile émulsion (g)	26.3	14.6	33.3	56.3	26.7
Masse huile phase solide (g)	56.5	32.18	35.6	72.7	197.0
Masse totale huile (g)	353.1	383.2	398.3	407.8	351.6
Masse huile libre (%)	76.5	87.6	82.7	68.5	36.4
Masse huile émulsion (%)	7.5	3.8	8.4	13.2	7.6
Masse huile phase solide (%)	16.0	8.4	9.0	17.3	56.0

^a activité en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$

- 5 [0050] Le procédé selon l'invention permet d'obtenir des résultats proches de ceux obtenus par les industries traditionnelles utilisant des solvants. L'émulsion obtenue contient très peu d'huile. A titre comparatif, il reste généralement 4-5% d'huile dans l'émulsion dans les procédés traditionnels avec solvant, et il reste 10-15% d'huile dans l'émulsion dans les procédés connus sans solvant, selon les graines.
- 10 [0051] Les concentrations en sucres varient de 40 à 90 g/l de phase aqueuse, pour un temps d'hydrolyse de 4 à 12 heures.
- [0052] Exemples 6 à 12
- 15 [0053] Les Exemples 6 à 12 sont traités de la même manière que les exemples ci-dessus mais sur des graines de colza et sans recyclage de l'émulsion séparée de la phase aqueuse.
- [0054] Pour les exemples 6 et 7, la durée d'hydrolyse est de 15 heures. L'exemple 6 est exempt d'activité férulate estérase.
- 20 [0055] A titre d'exemple comparatif, un lot de graines est traité de la même manière mais sans enzyme (Exemple 10 comparatif) ou avec les

mêmes enzymes mais avec des rapports entre activités ne faisant pas partie de l'invention.

[0056] Les résultats sont indiqués dans le tableau III suivant :

5

10

Tableau III

	Ex. 6 (inv.)	Ex. 7 (inv.)	Ex. 8 (inv.)	Ex. 9 (inv.)	Ex. 10 (comp.)	Ex. 11 (comp.)	Ex. 12 (comp.)
Temps (h)	15	15	4	4	4	4	4
Température (°C)	50	50	50	50	50	50	50
Agitation	300	300	300	300	450	300	330
pH	5.0	4.9	5.0	4.9	5.2	5.0	5.1
Rapport graines/eau	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67	0.67
Rapport enzyme/graine	0.05	0.05	0.05	0.05	0	0.05	0.05
betaglucosidase ^a	8	8	8	4.7	0	1.39	24.3
endocellulase ^a	14	14	14	119.8	0	218.2	35.8
exocellulase ^a	2	2	2	25.3	0	29.2	13.0
arabinanase ^a	10	10	10	1334.8	0	1511.1	697.0
xylanase ^a	0	0	0	1713.9	0	4139.1	12.6
Galactanase ^a	450	450	450	1000.8	0	175.2	907.2
Endopolygalacturo- nase ^a	57.9	57.9	57.9	61.7	0	0	126.62
pectine méthylestérase ^a	3.5	3.5	3.5	0.3	0	0	0.95
Férule estérase ^a	0	27	27	6.5	0	6.5	3.8
Masse d'huile libre (g)	180.9	202.0	51.7	118.8	15.0	91.4	70.0
Masse huile émulsion (g)	58.5	45.7	176.53	114.0	188.8	114.5	158.9
Masse huile phase solide (g)	44.3	39.4	66.42	63.67	95.9	98.4	101.1
Masse totale huile(g)	284	287.3	295.2	296.6	299.7	304.6	330.1
Masse huile libre (%)	63.7	70.3	17.5	40.1	5	30	21.2
Masse huile émulsion (%)	20.6	15.9	59.8	38.4	63	37.6	48.1
Masse huile phase solide (%)	15.6	13.7	22.5	21.5	32	32.3	30.6

^a activité en µmol/min/ml

5

[0057] Les exemples 6 à 9 mettent en évidence le rôle de la férule estérase.

[0058] L'exemple 9 d'une durée de 4 heures, montre le rôle du temps d'hydrolyse. Tout comme les exemples 7 et 8 réalisés avec le même mélange enzymatique mais avec une durée d'hydrolyse différente.

10 [0059] Les concentrations en sucres varient de 40 à 90 g/l de phase aqueuse, pour un temps d'hydrolyse de 4 à 12 heures.

[0060] Les concentrations en protéines sont de 30 à 35 g/l de phase aqueuse dès la première heure d'hydrolyse.

12

- 5 [0061] Les exemples comparatifs 10 à 12 montrent les avantages des rapports d'activité des mélanges enzymatiques utilisés dans le procédé de l'invention par rapport à des procédés sans enzyme ou utilisant des mélanges enzymatiques présentant des rapports d'activité différents de ceux de la présente invention. En particulier, le procédé utilisant les mélanges enzymatiques selon l'invention permet d'obtenir une plus grande masse d'huile libre que les procédés utilisant des mélanges enzymatiques présentant des rapports d'activité différents de ceux de la présente invention.

Revendications

1. Procédé d'extraction enzymatique en milieu aqueux d'huiles, de protéines et de sucres fermentescibles à partir de matière végétale, comprenant les étapes suivantes :
 - a) addition d'eau à de la matière végétale présentant une taille de particule appropriée,
 - b) addition d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0.14, de préférence compris entre 0.3 et 2.5, et plus préférentiellement entre 0.35 et 0.45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins $7 \cdot 10^{-3}$, de préférence compris entre $1 \cdot 10^{-2}$ et 0.5, et plus préférentiellement entre $1 \cdot 10^{-2}$ et $2 \cdot 10^{-2}$, l'activité de la pectinase étant inférieure à 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, et de préférence inférieure à 100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - c) incubation sous agitation de la matière végétale et du mélange enzymatique pour libérer dans le milieu réactionnel des huiles, des protéines et des sucres fermentescibles, pendant une durée dépendant des rendements recherchés,
 - d) séparation du milieu réactionnel pour obtenir de l'huile libre, une phase aqueuse contenant des protéines et des sucres fermentescibles, et une phase solide,
 - e) éventuellement séparation d'une émulsion de l'huile libre ou de la phase aqueuse, et recyclage de l'émulsion dans le milieu réactionnel,
 - f) séparation des protéines et des sucres fermentescibles de la phase aqueuse.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la taille de particule appropriée de la matière végétale est obtenue par broyage de ladite matière végétale.
3. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, dans lequel la masse d'eau ajoutée à la matière végétale est égale à 1 à 2 fois la masse de ladite matière végétale.
4. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, comprenant en outre, après l'étape a), une étape de désactivation des enzymes endogènes du mélange eau/matière végétale.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le mélange enzymatique contient les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :
 - cellulases :
 - betaglucosidase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 4.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - endocellulase : entre 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 27 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - exocellulase : entre 0 et 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 25.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - hemicellulases :

- arabinanase : entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 465 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1335 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- xylanase : entre 0 et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1700 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- 5 - galactanase : entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 750 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
- pectinases :
 - endopolygalacturonase : entre 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 61 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 10 - pectine méthylestérase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.
- 6. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel le mélange enzymatique comprend en outre une phénolate estérase, de préférence une férulate estérase, dont l'activité est comprise entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, et de préférence entre 4 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.
- 15 7. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la quantité du mélange enzymatique est comprise entre 0.25% et 10% en volume du mélange eau/matière végétale, de préférence entre 1% et 6%.
- 20 8. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'incubation selon l'étape c) est réalisée pendant 2 à 20 heures, à une température comprise entre 25°C et 75°C.
- 25 9. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'agitation prévue à l'étape c) est réalisée au moyen d'un mélangeur comprenant des pales plates favorisant le mélange et limitant le cisaillement.
- 30 10. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel aucune étape de correction du pH n'est prévue.
- 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel l'étape de séparation d) est réalisée au moyen d'un tricanteur.
- 35 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel la matière végétale est choisie parmi le groupe comprenant les tourteaux gras issus de la première pression et les graines d'oléagineux.
- 13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel les oléagineux sont choisis parmi le groupe comprenant le colza et le tournesol.
- 40 14. Utilisation, dans un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, d'un mélange enzymatique contenant au moins une cellulase, au moins une hémicellulase et au moins une pectinase, le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de la cellulase étant d'au moins 0.14, de préférence compris entre 0.3 et 2.5, et plus préférentiellement entre 0.35 et 0.45, et le rapport entre l'activité de la pectinase et l'activité de l'hémicellulase étant d'au moins $7 \cdot 10^{-3}$, de préférence compris entre $1 \cdot 10^{-2}$ et 0.5, et plus préférentiellement entre $1 \cdot 10^{-2}$ et $2 \cdot 10^{-2}$, l'activité de la pectinase étant inférieure à 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, et de préférence inférieure à
- 45

100 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ pour supprimer toute étape de correction du pH dans ledit procédé.

15. Utilisation selon la revendication 14, selon laquelle le mélange enzymatique contient les activités enzymatiques dans les proportions suivantes :

- 5
- cellulases :
 - β -glucosidase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 30 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 4.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 13 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - endocellulase : entre 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 200 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 27 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 10 - exocellulase : entre 0 et 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 25.5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - hemicellulases :
 - arabinanase : entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 465 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1335 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 15 - xylanase : entre 0 et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1700 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - galactanase : entre 300 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 750 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 1000 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 20 - pectinases :
 - endopolygalacturonase : entre 40 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 120 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 61 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 86 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$,
 - 25 - pectine méthylestérase : entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 20 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$, de préférence entre 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$ et 5 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.