

Nº 1959

Expediente núm.º
249336



REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

PATENTE DE INVENCIÓN

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una **PATENTE DE INVENCIÓN** por **VEINTE** años, en España

a favor de

ROHM & HAAS COMPANY, de nacionalidad
norteamericana domiciliado en 222 West Washington Square,
Philadelphia, Pensilvania, Estados Unidos de América.

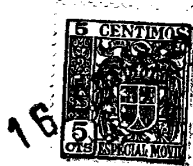
por:

« UN METODO PARA LA CONVERSION ENZIMATICA DE PARIEGINA ».

Nº 11680

Agente Sr. ELZABURO

16 JUN 1959 49335



249335

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de ROHM & HAAS COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 222 West Washington Square, Filadelfia, Pensilvania, Estados Unidos de América, por:

"UN METODO PARA LA CONVERSION ENZIMATICA DE NARINGINA".

Este invento se refiere a una conversión enzimática de naringina que mejora el sabor de las soluciones acuosas que contienen naringina. El invento se refiere asimismo a los jugos o zumos tratados con naringinasa de contenido reducido en naringina. Otro aspecto de este invento se refiere a la preparación enzimática del glucosido flavonoide, prunina.

La naringina es un compuesto que es responsable del sabor amargo característico en soluciones acuosas, incluyendo los jugos. La naringina es una ramosido-glucosido-hidroxi-flavanona. La parte de la molécula libre de ramosa, es decir, el glucosido del flavonoide hidroxilado se denomina "pru-

249335

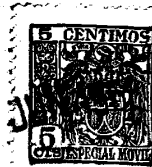


nina". La parte de la molécula de naringina libre de las dos partes de ramnosa y glucosa, es decir, el aglucon, se denomina "naringenina". La prunina y la naringenina, la última en una extensión limitada, son productos formados en nuestro método.

5 La naringinasa en este invento se define, según se indicará aquí en lo que sigue, como un principio enzimático que es capaz de producir ramnosa con o sin glucosa a partir de la naringina. De acuerdo con este invento, el tratamiento enzimático se lleva a cabo hasta que por lo menos el 15% de la naringina original se desdobra dando el producto prunina, pero antes de la conversión completa de prunina en naringenina, un segundo producto. La conversión de prunina en naringenina se detiene cuando queda, generalmente toda en solución, una cantidad de prunina que sea equivalente, por lo menos, al 15% de la naringina existente originalmente en el jugo tratado. Este invento se refiere asimismo a jugos mejorados de gustos aceptables, libres del sabor amargo desagradable y se caracteriza, además, por tener un contenido disminuido en naringina, un contenido en prunina relativamente elevado y una cantidad limitada de naringenina.

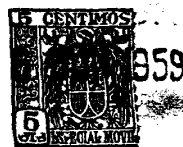
10 15 20 25 30 La naringina se encuentra en los jugos de determinados productos agrícolas; se encuentra en los jugos de frutas de las especies cítricas. Se encuentra en el jugo de la naranja tangerina y es muy frecuente en el jugo de toronja. La naringina existe en elevada concentración en la capa albedo, en las semillas, en el corazón y en las membranas de vegetales o frutas. Su sabor es claramente detectable en los jugos frescos, refrigerados, pasteurizados, enlatados y en los jugos congelados. El sabor de la naringina se observa asimismo en las secciones de frutos, en especial secciones de toronja, cuyo jugo contiene este principio amargo. Su concentración en el fruto es máxima en

249335¹⁶



la primera parte de la estación de la cosecha; como consecuencia de ello, los jugos extraídos de los frutos recogidos tempranamente son, particularmente, amargos, Por consiguiente, el -
gusto amargo de la naringina en los jugos es un problema de la
5 industria de elaboración de frutos y vegetales que ha evitado completamente la explotación comercial de diversas aplicaciones de dichos jugos de fruta que contengan naringina. De aquí que haya habido un urgente interés de los fabricantes de jugos que contengan naringina para encontrar métodos de mejorar el sabor
10 de dichos jugos reduciendo su contenido en naringina. Modernamente se ha sugerido tratar las soluciones acuosas que contengan naringina con carbón activo para absorberla en él, separando después el carbón por filtración. Este método físico-químico exige la calefacción del jugo y provoca, generalmente, la -
15 absorción no deseada de pigmentos naturales, compuestos pectínicos y aromas simultáneamente a la eliminación de naringina. En otro intento de mejorar el sabor de los jugos amargos, se ha propuesto el empleo de un principio enzimático capaz de degradar la naringina en fases hasta su componente primario, el
20 flavonoide hidroxilado, naringenina. Era de esperar que cuanto más completa fuese la degradación de naringina a naringenina, tanto mayor sería la mejora del sabor del jugo. Sin embargo, se encontró que dicho método tenía poco interés práctico, particularmente debido a su tendencia a la eliminación de sabores inferiores y a afectar perjudicialmente la turbiedad pectí-
25 nica natural del jugo. En contra de lo esperado, los solicitantes encontraron que la degradación completa de naringina a naringenina no solo no es conveniente, sino que por otra parte, limitando la conversión a naringenina en la extensión prescrita en este invento, se obtienen nuevos y valiosos resultados.
30

249335



Mientras que una hidrólisis degradativa de la naringina a naringenina parece ser que está considerablemente inhibida por las sustancias naturales presentes en el jugo, dichas sustancias de modo sorprendente no tienen ningún efecto inhibitorio importante en la conversión de naringina a prunina y conversión limitada en naringenina propuesta por los solicitantes. Otro aspecto interesante de este invento es que, a diferencia de las soluciones de este problema propuestas anteriormente, los solicitantes conservan las valiosas sustancias naturales que comunican gusto y la turbiedad pectínica deseada que pueden hallarse presentes en los jugos de frutas que contienen naringina. Todavía otro aspecto sorprendente de este invento es que, a diferencia de la hidrólisis degradativa de la naringina en la que el contenido de productos de solubilidad decreciente tienden a aumentar y a cristalizar, los solicitantes no encuentran tal problema de cristalización. Por el contrario, los productos de este proceso contribuyen al gusto natural y cuerpo del jugo tratado.

De acuerdo con el presente invento, se crea un método para la conversión enzimática de naringina que comprende el tratamiento de los jugos que contienen naringina con una preparación enzimática que contenga naringinasa hasta que (a) se efectúe la conversión prácticamente completa en prunina, en cuyo caso, la reacción tiene lugar en presencia de un compuesto auxiliar, tal como se define aquí, y que se halle disponible en una cantidad suficiente para evitar esencialmente la conversión de prunina en naringenina, o (b) hasta que, por lo menos, el 15% de naringina se convierta en prunina y antes de la conversión completa de la última en naringenina, quedando en la mezcla de reacción una cantidad de prunina que sea equivalente, por lo menos, al 15% de la naringina original.

249335



El invento proporciona además un jugo o zumo tratado con naringinasa de contenido reducido en naringenina, libre del gusto amargo desagradable y que tiene un sabor mejorado, estando dicho jugo (a) esencialmente libre de naringina y de naringenina y conteniendo solo esencialmente prunina en una cantidad -
5 equivalente a la naringina original, o (b) conteniendo prunina e identificándose además por tener una relación del contenido de prunina a naringina en el intervalo de 60:40 hasta que todo es esencialmente prunina sin naringina y además por una rela-
10 ción del contenido de prunina a naringenina en el intervalo de 40:60 hasta que todo es esencialmente prunina sin naringenina.

De acuerdo con este invento, el origen del jugo que contiene naringina no es decisivo. Puede obtenerse de productos - agrícolas o puede prepararse de materiales aislados o sintéticos. En la actualidad, las aplicaciones prácticas más valiosas
15 son las que se refieren al tratamiento de extractos, concentrados y jugos de productos agrícolas, como por ejemplo jugos de frutas o vegetales que contengan naringina por lo menos como uno de sus elementos amargos. Este invento es aplicable tam-
20 bien a la preparación de vinagres y mostos de frutos. En la memoria presente y en las reivindicaciones, el término "jugo" es genérico y se refiere a cualquier líquido de cualquier concentración obtenida de vegetales, frutas o cualquier parte componente de los mismos, como por ejemplo mondas y/o semillas -
25 que contengan naringina. El jugo puede obtenerse comprimiendo dicho producto que contenga naringina, en este caso, el jugo se designa como de consistencia simple. El término "jugo" se refiere también, aquí, a un jugo de más de un vegetal o fruta, o a mezclas de jugos de fruta o vegetales, o a mezclas de uno o más jugos de fruta con uno o más jugos vegetales. Los jugos
30 componentes de una mezcla simple no es preciso que contenga to-

249335



dos naringina. El jugo que se trata puede ser un jugo de consistencia simple, un producto de dilución del mismo o, como puede ser más frecuente, el jugo puede ser un concentrado. El jugo puede ser fresco, esterilizado o elaborado. Puede ser asimismo fruto segmentado tratado o fruto entero pelado, por ejemplo, segmentos de toronja.

El jugo que se trata puede tener pequeñas cantidades, tan pequeñas como un 0,001% de naringina. Los jugos amargos y los concentrados de los mismos pueden contener cantidades que oscilan hasta un 6% de naringina. Los jugos exprimidos directamente contienen, generalmente, de un 0,03 a 0,1% y más ordinariamente 0,03 a 0,08% de naringina. Cuando las concentraciones de naringina tienden a hallarse en el intervalo superior, por ejemplo de un 1% a 6% o incluso más en algunos casos en que la solución está sobresaturada, tiende a cristalizar algo de naringina. Sin embargo, incluso en tales casos, de acuerdo con el proceso de los solicitantes, la concentración de naringina se reduce eficazmente mientras que disminuye la sobresaturación gradualmente y pasa a la solución más naringina; finalmente, se alcanza la reducción deseada en el contenido de naringina. Este tipo de situación puede tener lugar en la preparación de melazas cítricas en donde, por consiguiente, nuestro invento tiene un valor práctico particular.

La cantidad de preparación enzimática que contenga naringinasa empleada para el tratamiento en aquella cantidad que sea eficaz para disminuir el contenido de naringina hasta la concentración deseada. Una cantidad tan pequeña como el 0,001% de preparación enzimática de naringinasa puede afectar al contenido en naringina; generalmente, se emplea una proporción de 0,01 a 0,5% y, de preferencia, de 0,01 a 0,05% de pre-

249335

16 J



paración enzimática. No parecen necesarias concentraciones superiores a un 1%. La cantidad de preparación enzimática que contenga naringinasa puede ajustarse de acuerdo con la temperatura a la que se realice el tratamiento, conduciendo, en general, las temperaturas superiores a una conversión más rápida de la naringina. La preparación enzimática conteniendo naringinasa puede añadirse en forma de polvo o líquido. Las preparaciones líquidas pueden obtenerse a partir de polvo antes del tratamiento. Cuando se añade la preparación enzimática que contenga naringinasa al jugo, es preferible mezclar el jugo y la enzima por lo menos durante algún tiempo, con objeto de conseguir la reacción y solubilización más completa que fuese necesaria. El mezclado de la enzima puede realizarse poco a poco o bien inicialmente de una sola vez.

Hemos descubierto que la actividad de la naringinasa tiene lugar en el intervalo de pH desde 9, aproximadamente, hasta un pH tan bajo como 2,5. Las preparaciones enzimáticas que contienen naringinasa son muy eficaces en el intervalo de pH de 5,0 a 3,0 que es el pH natural de la mayoría de los jugos. La actividad enzimática en la zona ácida es, particularmente, ventajosa, puesto que los valores bajo ácidos del pH es más probable que se presente en los frutos tempranos de la estación en los que la concentración de naringina tiende a ser elevada. En efecto, el tratamiento de frutos tempranos de la estación, es decir, frutos en los que la relación Brix ácido sea baja, aumenta el valor del invento de los solicitantes, puesto que en este periodo las concentraciones de naringina tienden a ser elevadas y el sabor dulce de la sacarosa que lo disimula tiende a hallarse en un mínimo. En el presente invento y en las reivindicaciones el "jugo temprano de la estación", que se deriva de



249335

frutos tempranos de la estación, se define como un jugo en el que la relación de Brix a ácido oscila entre 6:1 y 12:1 y se halla, en general, en el intervalo de 6,5:1 a 8,5:1. "Brix" se define como sólidos solubles totales, en general, la mayor parte de ellos azúcar; el ácido se calcula como ácido cítrico anhidro por 100 ml. de jugo. La relación Brix ácido varía de acuerdo con la región en que se desarrolló el fruto. Por ejemplo, la toronja temprana de estación en Texas se aproxima a una relación 8,0:1, mientras que la toronja de Florida frecuentemente se aproxima a 6,5:1.

La temperatura a la que puede realizarse el presente tratamiento es preferible mantenerla durante una gran parte del tiempo entre unos 5° y unos 60° C. Para una conversión rápida es conveniente una temperatura en el intervalo de 25° a 50° C., si bien la naringinasa es, asimismo, activa a temperaturas en el intervalo de unos 25° a 5° C. La actividad de la naringinasa en este intervalo inferior de temperatura es un aspecto de utilidad del invento que permite el tratamiento de jugos que contienen naringina mientras se conservan con refrigeración. Se ha encontrado que una combinación particularmente eficaz de pH y temperatura para numerosas aplicaciones industriales es un intervalo de pH de 3,0 a 4,5, aproximadamente, en un intervalo de temperatura de 25° a 35° C., Esta combinación de condiciones tiende a provocar rápidas mejoras en el jugo tratado de naringina.

De acuerdo con el método del invento, las preparaciones enzimáticas que contienen naringinasa provocan un desdoblamiento de la naringina dando prunina y de la prunina, en una extensión limitada, dando naringenina. El desdoblamiento de la naringina dando prunina alcanza, por lo menos, un 15% de la con-



249335

centración inicial de naringina; de preferencia alcanza un 40% a 60%, aproximadamente. Puede llegar, prácticamente, al 100% de conversión. En cualquier caso, la conversión en naringenina se controla con objeto de conservar una cantidad de prunina --
5 equivalente, por lo menos, al 15% y, preferentemente, por lo menos, al 50% de la naringina original en el jugo. De acuerdo con algunos aspectos especiales de este invento, la conversión de naringina se halla limitada a la formación de prunina, no dejando que tenga lugar esencialmente ninguna conversión en naringenina y siendo la cantidad de prunina prácticamente equivalente a la disminución del contenido original de naringina del jugo.
10

Las dos fases en la conversión de naringina en naringenina pueden tener lugar, simultáneamente, por lo menos, durante una gran parte del tiempo. Sin embargo, es posible lograr la conversión en prunina de modo prácticamente completo antes de que tenga lugar una importante conversión en naringenina.
15

El procedimiento de este invento se lleva a cabo con preparaciones enzimáticas que contengan naringinasa que pueden obtenerse de diferentes orígenes. Las preparaciones pueden extraerse de tejidos de plantas, por ejemplo de las hojas, albedo, y flavado de frutos cítricos, del apio y del ruibarbo. La preparación necesaria que contienen naringinasa puede obtenerse también de bacterias y hongos. Las enzimas apropiadas para su empleo en este invento se elaboran, por ejemplo, por diversos hongos. Son fuentes de hongos particularmente ricas los del género *aspergillus*, como por ejemplo A.niger, A.alliaceus, A.Wentii y otros. Asimismo, otros hongos, como por ejemplo ciertas especies del género *penicillium* pueden ser inducidas a producir la naringinasa necesaria en la combinación apropiada de condiciones. Es preferible el desarrollo de las cepas que pro-
20
25
30



16
249335

ducen naringinasa en un medio de cultivo que favorezca el desarrollo de la actividad deseada en un grado elevado. Para producir el necesario principio enzimático pueden llevarse a cabo los métodos de cultivo en bandeja o de propagación sumergida de la cepa deseada. Los ingredientes y proporciones de los mismos esenciales para conseguir el desarrollo del organismo elegido son conocidos por los prácticos en la materia. Sin embargo, se ha encontrado que, con objeto de provocar la producción de naringinasa, puede añadirse al medio para el desarrollo alguna forma de pulpa de un producto agrícola, como por ejemplo pulpa de remolacha, pulpa de frutos cítricos, pulpa de naranja y limón, residuos de uva o pulpa de manzanas. Se ha encontrado que son convenientes productos residuales de Steffens y materias pécticas en cantidad limitada.

15 Junto con los ingredientes indicados del medio, debe emplearse asimismo una fuente de nitrógeno. Esta debe hallarse en forma de compuestos nitrogenados sencillos, como por ejemplo nitratos o sales amónicas o en forma de compuestos nitrogenados más complejos, como aminoácidos, peptidos o proteínas. El medio de desarrollo se esteriliza y, a continuación, se inocula con el organismo apropiado. El desarrollo se lleva a cabo a un pH generalmente por debajo de 7 durante la mayor parte del tiempo y, generalmente, entre 3 y 7. Puede proporcionarse aireación y/o agitación para conseguir el desarrollo del organismo que se desee. La temperatura óptima para el desarrollo del sistema enzimático deseado oscila de unos 20° a 35° C. Un desarrollo adecuado se obtienen, en general, en unas 72 a 116 horas. Al cabo de este tiempo se cosecha el caldo bruto. La concentración de la enzima puede realizarse mediante el empleo de materiales de absorción o mediante precipitación y aislamiento

2493356



de los principios activos deseados. La precipitación de las enzimas puede efectuarse mediante la adición de sales y/o de un disolvente orgánico que sea miscible con el agua, como los alcoholes metílico, etílico o propílico, acetona o dioxano. El precipitado se recoge y se seca a una temperatura relativamente baja, por ejemplo, en el intervalo de 10° a 35° C. y, de este modo, se obtiene un extracto bruto que contiene los principios enzimáticos deseados. Si se desea separar de la preparación enzimática que contiene naringinasa los sistemas enzimáticos que actúan sobre la pectina, la preparación enzimática que contiene la naringinasa puede tratarse con tiourea o urea.

Una preparación enzimática standard que contiene naringinasa es la que efectúa, por lo menos, el 25% de hidrólisis de la solución de naringina original al 0,05% a 50° en un intervalo de pH de 4,0 a 5,0, dando, por lo menos, 0,0008 g. de ramosa y de 0 a 0,009 g. de glucosa en estas condiciones normales. El desarrollo de la hexosa ramosa, con o sin glucosa, caracteriza las preparaciones enzimáticas que contienen naringinasa. Por tanto, la naringinasa puede considerarse como un principio enzimático que produce ramosa con o sin glucosa a partir de naringina.

La concentración de naringina o naringina y prunina en un momento dado se determina de acuerdo con el ensayo de Davis -- (W.B. Davis, Anal.Chem. 19, 476 (1947)).

De acuerdo con el ensayo de Davis se prepara lo siguiente: una solución alcalina de dietilen-glicol a partir de 950 ml. de dietilen-glicol, 13,3 ml. de hidróxido sódico 6N y 36,7 ml. de agua.

A 10 ml. de esta solución se le añaden 0,2 ml. de la solución enzima-sustrato a ensayar. Se produce un color amarillo. --

249335



Al cabo de 20 minutos la intensidad del color se determina espectrofotométricamente. La intensidad absoluta del color amarillo es proporcional al contenido en naringina o en naringina más prunina. Mediante comparación con una curva standard -
5 que represente la intensidad de color dada por concentraciones conocidas de naringina, puede determinarse la concentración - de naringina más prunina de un producto desconocido. La cantidad de prunina formada por una preparación enzimática que -
10 contenga naringinasa en un momento dado en una muestra particular es la diferencia entre la cantidad de naringenina formada por una preparación enzimática que contenga naringinasa y la cantidad total de naringenina formada como resultado del -
15 tratamiento posterior de la muestra con un exceso de la enzima emulsina a 35° C. y un pH de 5,0 hasta que tenga lugar la hidrólisis completa de la prunina. Prácticamente, el tanto - por ciento de naringina convertida en prunina es un momento -
dado es igual a

$$\left(\begin{array}{l} \text{tanto por ciento de naringina} \\ \text{a naringenina despues del tra-} \\ \text{tamiento con emulsina} \end{array} \right) - \left(\begin{array}{l} \text{tanto por ciento de} \\ \text{naringina a naringe-} \\ \text{nina antes del trata-} \\ \text{miento con emulsina} \end{array} \right)$$

20

La emulsina es una preparación extraída de plantas que tiene actividad enzimática de -glucosidasa que no afecta a la naringina. La enzima se utiliza preferentemente en forma cristalizada. Las preparaciones de emulsina se hallan disponibles
25 comercialmente.

La determinación de prunina transcurre en la forma siguiente: Despues de calentar la muestra para inactivar la enzima, si estuviese presente, se determina la concentración de naringina más prunina mediante el ensayo Davis en una determinada muestra. A continuación, la muestra se trata con emulsina
30



24335

para hidrolizar toda la prunina a naringenina. . Esta hidrólisis lo mejor es realizarla con un exceso de emulsina, en una cantidad de 0,2 a 0,8% de la misma, de preferencia emulsina -
5 cristalizada, en condiciones que favorezcan la hidrólisis por emulsina, por ejemplo un pH de aproximadamente 4,5 a 5,0 y una temperatura de unos 30 a 35° C. Cuando la hidrólisis de prunina es completa, el contenido en naringina se determina de nuevo por medio del ensayo Davis. El aumento de naringenina o la
10 disminución subsiguiente de naringina corresponde a la cantidad de prunina presente antes del tratamiento con emulsina. - Cuando la muestra es un jugo tratado con naringinasa, la disminución posterior de naringina corresponde a la cantidad de prunina presente despues del tratamiento con naringinasa. De --
15 acuerdo con este invento, es esencial que el desdoblamiento enzimático de la naringina se detenga antes del momento en el que la prunina residual sea, por lo menos, equivalente al 15% de la naringina original, generalmente en el intervalo del 40% a 85% referido al contenido original de naringina.

La actividad de la naringinasa sobre la naringina puede
20 detenerse en el momento especificado mediante una serie de métodos. Por ejemplo, el jugo tratado puede calentarse a una temperatura por encima de 80° C. durante un breve periodo de tiempo, por ejemplo durante 2 minutos, a a 90° C. durante 1 minuto. Por otra parte, el jugo puede ser pasteurizado rápida-
25 mente, tratado por vibraciones ultrasónicas o por la luz ultravioleta. Otro método que puede ser muy ventajoso en determinadas circunstancias es congelar el jugo tratado de acuerdo con los métodos de congelación rápida. En los casos en que el jugo se trata despues con agentes clarificantes, por ejemplo -
30 enzimas clarificantes, las preparaciones que contienen narin-

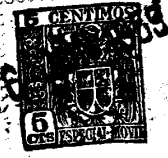


249335

ginasa, pueden separarse del jugo tratado junto con las enzimas clarificantes o inactivarse junto con ellas. Para detener la actividad de la naringinasa, el pH puede elevarse por encima de 9,0 o rebajarse por debajo de 2,5 con agentes químicos, como
5 por ejemplo ácidos minerales u orgánicos fuertes, por ejemplo - ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido hidrobenczoico, ácido oxálico o ácido ftálico o bien bases, incluyendo los hidróxidos de metales alcalinos o de metales alcalinotérreos, por ejemplo hidróxido sódico. Se ha descubierto, asimismo, que la acción en-
10 zimática puede detenerse esencialmente mediante la adición al jugo tratado de un exceso de azúcar, de preferencia glucosa, para conseguir una concentración final por lo menos del 2%, preferentemente, por lo menos, del 5% en el jugo. Este aspecto excepcional de este invento es particularmente útil porque permite
15 tratar un jugo amargo que contenga naringina y, posteriormente, en el momento indicado en que queda la prunina en el jugo en una cantidad equivalente por lo menos al 15% de la naringina original, añadir azúcar en exceso para preparar un jugo - endulzado, pero sin sabor amargo.

20 El primer momento en el que debe detenerse la acción de la naringinasa es cuando haya tenido lugar aproximadamente un 15% de conversión de naringina en prunina. En general, la concentración de naringina alcanza límites muy satisfactorios cuando haya tenido lugar la conversión de naringina en prunina en
25 una cantidad del 40% al 60%. En condiciones particularmente favorables y con determinadas preparaciones enzimáticas que contengan naringinasa, la conversión de naringina en prunina puede alcanzar, de modo rápido, prácticamente un 100%.

30 En todo caso, la conversión de naringina en naringenina se detiene cuando la prunina residual es equivalente, por lo



249335

menos, al 15%, generalmente del 50% al 85% y mas especialmente del 85% al 100% de la naringina original.

5 Los productos preferidos de este invento se caracterizan por una combinación de propiedades excepcionales. El jugo tratado por la enzima contiene una cantidad residual de naringina no mayor del 40% del contenido original de naringina.

10 Los productos que no tienen prácticamente naringina residual son especialmente notables por su sabor y aroma cuando se hidrolizan de acuerdo con este invento. Sin embargo, el bajo contenido en naringina residual es solo un factor que contribuye a las propiedades excepcionales de nuestros jugos. Junto con ello, el contenido en naringenina de los jugos preferidos debe ser bajo, como lo es cuando se conserva la prunina, de preferencia en una cantidad equivalente al 40%-85% de la naringina original. Cuando no existe esencialmente naringenina, se obtiene un jugo especialmente conveniente. Como resultado de las bajas concentraciones de naringina y naringenina, el contenido en prunina es, por tanto, apreciable y oscila del 40% al 85% e, incluso, hasta el 100%. Este factor parece que contribuye de modo importante a la calidad de los productos preferidos de los solicitantes. Por consiguiente, éstos pueden identificarse ademas por contener siempre, por lo menos, el 40% de la naringina original en forma de prunina, siendo la relación del contenido de prunina a cualquier contenido en naringina presente desde, por lo menos, 40:60 hasta ser todo prunina y no existir naringina. Los productos preferidos se identifican, ademas, por la relación del contenido en prunina al contenido en naringenina que es, por lo menos, 40:60 e, incluso, más, de preferencia en el intervalo de 60:40, referido a la naringina original. En casos excepcionales, todo es prunina, sin que se forme nada de na-

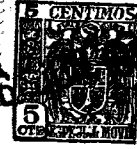
15

20

25

30

249335



5 ringenina. Hay una situación única en la que no solo no se forma naringenina, sino que tampoco hay naringina residual, conteniendo el producto esencialmente en su totalidad prunina. Por tanto, los productos preferidos de este invento se identifican, a diferencia completa de los productos naturales, por la presencia de prunina generalmente en cantidades elevadas, cantidades reducidas de naringenina, si es que existen, y, asimismo, cantidades reducidas de naringina, si existen. Las otras propiedades excepcionales que caracterizan los productos preferidos de este invento son la falta del gusto amargo perjudicial, el color inalterado, un gusto a fruta que ya no está enmascarado por el principio amargo de la naringina. La turbiedad pe ctínica deseada se conserva prácticamente inalterada.

15 Otro aspecto de gran valor de este invento es un método enzimático para la preparación de prunina. Según se indicó anteriormente, la prunina es el glucosido flavonoide de la naringenina. Laprunina es, asimismo, un compuesto que pertenece a un grupo de flavonoides que, como la hesperidina y la rutina, son de gran utilidad debido a su acción vitamínica aumentando la resistencia a la ruptura de los capilares de la sangre. Mientras que la naringina y otros ramno-glucosidos flavonoides similares son muy fácilmente asequibles en la naturaleza, el correspondiente glucosido ha sido relativamente difícil de obtener, en estado natural o a partir del ramosido-glucosido antes indicado. Los intentos anteriores para eliminar la parte de ramosa de una biosa unida a un flavonoide dieron lugar a la eliminación de la biosa completa. Se ha descrito asimismo el ensayo sin éxito de procedimientos de hidrólisis empleando ácidos como, por ejemplo, el sulfúrico, acético, fosfórico y cítrico. Recientemente se ha propuesto un método en el que se utiliza un alco-

249335



hol cicloalifático y ácido fórmico. Este procedimiento es relativamente lento, precisando de 10 a 30 horas para lograr resultados adecuados.

De acuerdo con el método del presente invento, una preparación enzimática que contenga naringinasa del tipo indicado anteriormente se deja actuar sobre la naringina en solución en presencia de un exceso de un compuesto, generalmente un azúcar, en especial glucosa, u otro azúcar como la manosa, u otro compuesto, como ácido glucónico, ácido tánico, ciclohexil- β -D-glucosido y gluconolactona, o mezclas de 2 o más de estos compuestos que pueden emplearse esencialmente con un efecto equivalente. Calculada en peso, la glucosa debe estar presente, preferentemente, en una cantidad en el intervalo de 40 a 200 partes por cada parte de naringina; y la gluconolactona debe estar presente en una cantidad que oscila de 1,0 a 5 partes por cada parte de naringina. Los otros compuestos deben hallarse presentes en cantidades intermedias que oscilan de 1,0 a 1000 partes por cada parte de naringina. La preparación de naringinasa se utiliza en las cantidades citadas anteriormente; la concentración original de naringina no es particularmente crítica. La naringina puede estar presente toda en solución o solamente en parte, como en casos en que existe naringina en forma de cristales debido a la saturación de la solución. A medida que tiene lugar la hidrólisis, se disuelve gradualmente más naringina. Se obtienen rápidamente conversiones excelentes que en general sobrepasan el 90% en prunina. La prunina cristaliza por concentración del medio acuoso. Se purifica por recristalización.

El invento se aclara además mediante los siguientes ejemplos, en los que las partes son en peso y los porcentajes son en peso por volumen. En los ejemplos, los porcentajes indicados

249335



se refieren a la cantidad de naringina original convertida en prunina y/o naringenina. En todo caso, para obtener las concentraciones reales, los valores de naringina pueden multiplicarse por un factor de 0,47 y, análogamente, los valores de prunina pueden multiplicarse por un factor de 0,75.

En los ejemplos siguientes el tratamiento se realiza en muestras de un litro:

Producción de una preparación típica que contenga naringinasa

Una preparación enzimática que contenga naringinasa se obtiene preparando un medio de desarrollo con los ingredientes siguientes en las proporciones indicadas:

Salvado de trigo	5 gramos.
Harina de soja	3 gramos
Residuos de Steffen	0,5 gramos
Fosfato amónico	2,5 gramos.
Naringina	0,25 gramos.

Se añade agua para completar 190 ml. Este medio se ajusta a un pH de 6 con 0,2 a 0,5 ml. de hidróxido amónico y se esteriliza en un matraz Erlenmeyer de boca ancha. El medio estéril enfriado se inoculara asépticamente con esporas de una cepa de Aspergillus niger. Los matraces inoculados tapados con algodón se agitan durante 48 horas a 28° C. en un agitador Gump. 10 ml. de este cultivo se transvasan asépticamente a matraces previamente esterilizados que contengan 140 ml. del medio de desarrollo anterior. Al cabo de 96 horas en el agitador Gump. a 28° C. el cultivo se filtra y en una parte del filtrado se ensaya la actividad enzimática deseada.

Un ml. del filtrado enzimático se ensaya de acuerdo con el ensayo del tanzado del p-nitrofenil- β -d-glucosido. Por él se determina que el filtrado enzimático produzca por lo menos

249335



0,5 x 10⁻³ moles de p-nitrofenol a partir de una solución 1,67 x 10⁻³ molar en 20 minutos a 28° C. y a un pH de 5. A este filtrado enzimático se le añaden 4 volúmenes de isopropanol. Se forma un precipitado que pronto se sedimenta. El líquido que sobrenada se separa por decantación y el precipitado se pone en suspensión en 3 volúmenes de alcohol frío. El precipitado se separa a continuación por centrifugación y se seca en una capa delgada a unos 35° C.

Una muestra de esta preparación enzimática se ensaya en una solución de naringina al 0,05% preparada a partir de naringina cristalizada y ácido cítrico y que tenía un pH de 4. 0,2 ml. de una solución de la enzima al 2,5% se mezclan con una porción de 25 ml. del sustrato. Después de incubación a 50° C. durante dos horas, se ensaya cromatográficamente en porciones del sustrato la presencia de ramosa y/o glucosa. Se encontró que se liberan 0,0008 g. de ramosa y 0,0009 de glucosa.

Ejemplo 1

Un jugo fresco de toronja extraído de frutos escogidos de Texas, que tenían un gusto fuerte y claramente amargo, se analizó determinando la concentración total de flavonoides por el método Davis.

De un modo general, se añadió un gran exceso de enzima para hidrolizar completamente la naringina, dejando otros flavonoides. La disminución de la intensidad del color después de la hidrólisis enzimática es proporcional al contenido original de naringina. El valor real se determina a continuación a partir de una curva standard. El método se realiza como sigue: se mezclan

0,2 ml. de jugo



243333

10 ml. de dietilen-glicol alcalino preparado a partir de 950 ml. de dietilen-glicol, 13,3 ml. de NaOH 6N y 36,7 ml. de agua.

5 Se desarrolla gradualmente un color amarillo. Al cabo de 20 minutos la intensidad del color amarilló se determina en un espectrofotómetro. Coleman Junior en tubos de ensayo calibrados. El contenido en naringina se determina a partir de una curva patrón preparada de concentraciones conocidas en el intervalo necesario. El contenido original de naringina se encontró que era 0,07%.

10 Se mezclan con el jugo 2,5 g. de preparación enzimática que contiene naringinasa obtenida según se describió anteriormente. El pH del jugo es 3,5. El jugo se mantiene a 28° C. con agitación intermitente. Periódicamente se determinan las concentraciones de naringina y prunina y se calcula el aumento de la concentración de naringenina. Cuando la concentración de naringina se ha reducido a 0,038%, el jugo se calienta durante 15 minutos a 100° C. La naringina convertida en prunina se encontró que era 0,026%. El aumento de la concentración de naringenina se encontró que era 0,006%. El jugo de toronja resultante sin sabor amargo es entonces apto para el consumo humano. Tiene un gusto delicado recalcado por la eliminación agradable del sabor excesivamente amargo.

20 Se siguió el mismo procedimiento manteniendo el jugo a 35° C. La hidrólisis es, incluso, más rápida. Cuando se emplean 25 g. de preparación enzimática a 25° C. tiene lugar una hidrólisis muy eficaz.

Ejemplo 2

30 Mediante el mismo procedimiento, se trató jugo de toronjas escogidas que contenía 0,076% de naringina con 0,5 g. de

249335¹⁶



la preparación enzimática anterior hasta que la naringina original disminuyó a 0,04%, la concentración de prunina es de -- 0,030% y el contenido en naringenina aumentó en 0,006%.

5 Otra muestra de este jugo se trató con refrigeración a una temperatura de unos 10° C. Tiene lugar un desdoblamiento gradual de la naringina, bien controlado. El jugo se pasteurizó rápidamente cuando el contenido en naringina se redujo a 0,03%. El contenido en prunina es 0,037% y el aumento en -- la concentración de naringenina es de 0,009%, referido a la concentración de naringina original.

10 Otra muestra se trató a 52° C. Después de un periodo de hidrólisis algo mayor se obtuvo un producto con sabor amargo disminuido.

Ejemplo 3

15 Un jugo de toronja enlatado, sin endulzar, y obtenido de toronja Pinkmeat Texas que tenía un contenido en naringina de 0,058%, se calienta a unos 50° C. y se mezcla una preparación de naringinasa produciendo una concentración enzimática de 0,15%. La temperatura se mantiene a 50° C. durante una hora. Al cabo de este tiempo el análisis de naringina indica -- una reducción del 90% hasta un contenido de naringina de 0,006%, un contenido en prunina de 0,047% y un contenido aumentado de naringenina de 0,005%, referido a la concentración original de naringina. El jugo se calienta a más de 120° C. 25 durante un minuto. La muestra obtenida está exenta de gusto amargo objeccionable y tiene un sabor delicado, agradable y dulce. El jugo puede consumirse solo; es muy apropiado para -- mezclarlo en grandes cantidades con otros jugos de frutas como naranja, limón, piña y albaricoque.

249335



Siguiendo un procedimiento análogo, el jugo se trata a 60° C. dando un producto libre de sabor amargo objeccionable.

Ejemplo 4

5 Una muestra de jugo de toronja enlatado, endulzado, que tenía un contenido en naringenina de 0,058% se trató a 35° C. durante dos horas con 0,20% de preparación enzimática, al ca-
bo de cuyo tiempo el contenido en naringina se redujo en más
del 95% hasta 0,003%. El contenido en prunina es de 0,053% y
10 el contenido en naringenina, referido a la naringina original, ha aumentado en 0,002%. La acción enzimática se detiene por congelación del jugo. Se obtiene un jugo dulce exento del sa-
bor amargo objeccionable.

Ejemplo 5

15 Se extrae toronja de Indian River y la parte principal del jugo exprimido se aparta para el tratamiento posterior. Los residuos y mondas de toronja se exprimen despues a presión elevada e nteniendo el jugo obtenido naringina en la cantidad
20 de 0,118%. Tiene un gusto amargo muy desagradable que lo hace inadecuado para el consumo humano. Con este jugo se mezclan 0,5% de preparación que contiene naringinasa mientras que la temperatura se mantiene a 45° C.. Despues de una hora de tratamiento el análisis del contenido en naringina indica
25 una reducción del mismo al 0,014%. El contenido en prunina es de 0,094% y la naringenina aumentó a 0,010%, referido a la concentración original de naringina. El jugo está entonces libre de la mayor parte de su sabor amargo desagradable. No se observa pérdida de la turbidez y opalescencia del jugo. La acción
30 enzimática se detiene por pasteurización. El jugo producido es

249335¹⁶



de utilidad para mezclarlo con el jugo obtenido directamente o para concentración a melazas cítricas.

5 El jugo exprimido directamente, anterior, que contenía una cantidad inicial de naringina de 0,07% se trata con un l. de preparación de naringinasa. En media hora a 25° C. no queda prácticamente naringina. El contenido en prunina es de 0,056%. El jugo sin sabor amargo se concentra tres veces en vacío, se enlata y se congela.

10 Ejemplo 6

Un jugo de toronja obtenido a partir de frutos tempranos y que tenía una relación Brix ácido de 6 a 1 y un contenido inicial de naringina de 0,09%, se trata con 0,1% de una preparación enzimática que contenga naringinasa a 25° C. Después de 15 dos horas de tratamiento, el contenido de naringina se reduce a 0,03% y el contenido en prunina es de 0,03% mientras que la naringinina ha aumentado a 0,006%. Este jugo temprano está exento del sabor amargo desagradable; tiene un gusto refrescante. Es muy adecuado para jugos de bajo contenido en azúcar o 20 para mezclar con otros jugos.

De un modo análogo se trató una mezcla de 50 partes de jugo de naranjas tangerinas tempranas y 50 partes de jugo de toronja temprana. La mezcla resultante se halla exenta de sabor amargo desagradable. Los gustos delicados del jugo se han 25 conservado completamente.

Ejemplo 7

En una caldera de 19 litros se trata un jugo fresco de toronja, que contenga 0,12% de naringina, con dióxido de azufre para esterilizar el jugo. El jugo se inocula a continua- 30

249335



16 JUN 1959

5 ción con células de una levadura, Saccha-romyces ellipsoideus. Manteniendo la temperatura a 30° C. se efectúa una fermentación enérgica. Cuando la fermentación ha terminado, se separa la levadura y el mosto de toronja se trata a continuación con una preparación de naringinasa al 1% a 50° C. Al final del tratamiento se obtiene un vino que tiene un gusto esencialmente - mejorado y un contenido rebajado en naringina. En otro experimento, el jugo de toronja se trata con naringinasa antes de la fermentación con levadura.

10 De un modo análogo, el jugo de toronja, antes o después del tratamiento con naringinasa, se trata con una especie apropiada de Acetobacter con objeto de preparar un vinagre de toronja. El producto tiene sabor amargo disminuido.

15 Ejemplo 8

Jugo de toronja extraído de frutos de invierno de Florida que tenía una relación Brix ácido de 6,5 a 1 y un contenido en naringina de 0,12% se trató con 0,5% de naringinasa a 50° C. Después de dos horas, el contenido en naringina disminuyó en el 80%, dando un contenido en naringina de 0,024% y un contenido de prunina de 0,081%; la naringina aumentó hasta un contenido de 0,015%. Se añadió entonces exceso de glucosa, dando una concentración total del 5%. El jugo endulzado sin sabor - amargo se concentró y se congeló para su empleo posterior.

25 Ejemplo 9

30 2 g. de naringina recristalinada se disolvieron en aproximadamente 800 ml. de agua caliente. A esta solución se le añadieron 10 g. de gluconolactona y 6 g. de ácido nítrico. El pH se ajustó a 4 con hidróxido sódico. El volumen se completó -

249335¹⁶³



5 hasta un litro. Se añadieron 5 g. de preparación enzimática de naringinasa y la temperatura se mantuvo a 50° C. durante 2 horas. El análisis indica la conversión esencialmente completa de naringina en prunina. La solución se concentró a vacío y la prunina bruta precipitó. El producto se recristalizó varias veces de una solución metanol-agua.

Ejemplo 10

10 5 g. de naringina se añadieron a 450 ml. de agua caliente a 50° C. Parte de la naringina quedó sin disolver. Se añaden - 120 g. de glucosa y 3 g. de ácido nítrico. El pH se ajustó a - 3,5. 3 g. de preparación enzimática de naringinasa se mezclaron con la solución. Al cabo de 6 horas, durante cuyo tiempo la naringina restante se disolvió por mezcla intermitente, toda -
15 la naringina se ha convertido esencialmente en prunina. La prunina se recuperó por cristalización.

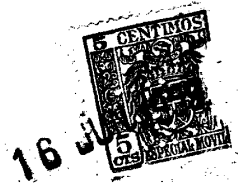
De un modo análogo, se preparó prunina realizando el procedimiento anterior a unos 15° C. La preparación dura algo más de tiempo.

20 20 g. de los 120 g. de glucosa total de este ejemplo se sustituyeron por dos gramos de gluconolactona y la hidrólisis se realizó siguiendo el mismo procedimiento. Se obtuvieron resultados igualmente satisfactorios.

25 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, el 26 de mayo de 1958, bajo el número 737.477 se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

30 Los puntos de invención propia y nueva que se presentan pa-



ra que sean objeto de esta patente de invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

5 1.- Un método para la conversión enzimática de naringina que comprende el tratamiento de jugos que contienen naringina con una preparación enzimática que contenga naringinasa hasta que (a) se efectúe la conversión esencialmente completa en prunina, en cuyo caso, la reacción tiene lugar en presencia de un compuesto auxiliar, tal como se ha definido aquí, que se halla disponible en una cantidad suficiente para evitar, esencialmente, la conversión de prunina en naringenina, o (b) hasta que, por lo menos, el 15% de naringina se convierte en prunina y antes de la conversión completa de la última en naringenina, quedando en la mezcla de reacción una cantidad de prunina que sea equivalente, por lo menos, al 15% de la naringina original.

15 2.- Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que dichos jugos que contienen naringina se tratan en un intervalo de pH de 2,5 a 9 y en un intervalo de temperatura de 5 a 60° C.

20 3.- Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por el hecho de que el jugo que contiene naringina contiene un jugo vegetal o una mezcla de dichos jugos, o un jugo de frutas o una mezcla de dichos jugos o bien una mezcla de jugos vegetales y de frutas, siendo dichos jugos frescos, esterilizados o elaborados.

25 4.- Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado por el hecho de que el jugo que contiene naringina contiene jugo de toronja.

30 5.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por el hecho de que la prepara-

2493358



ción enzimática contiene de 0,001% a 1,0% en peso de la misma de naringinasa.

5 6.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que dicho compuesto auxiliar es (a) un azúcar, o (b) gluconolactona, o (c) ácido glucónico o tánico o ciclohexil- β -d-glucosido o moléculas de dos o mas de estos compuestos, estando dichos compuestos -- (a), (b) y (c) presentes en la mezcla, respectivamente, en una cantidad en el intervalo de 40-200 partes, 1,0-5 partes y -- 10 1,0-1000 partes por cada parte de naringina.

7.- Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por el hecho de que en el procedimiento (b) se evita la conversión completa de grunina en naringenina interrumpiendo la acción enzimática como resulta 15 do de la inactivación de la naringinasa.

8.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que dicha inactivación se consigue -- calentando el jugo tratado a una temperatura superior a 80° C. durante un corto periodo de tiempo, o pasteurizándolo instan- 20 táneamente o sometiénolo a vibraciones ultrasónicas o a la luz ultravioleta, o congelándolo, o elevando su pH por encima de 9,0 o rebajándolo por debajo de 2,5.

9.- Un método de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por el hecho de que dicha inactivación se consigue 25 añadiendo al jugo tratado exceso de azúcar, preferentemente -- glucosa, para conseguir una concentración final, por lo menos del 2%, preferentemente, por lo menos, del 5% en el jugo.

10.- Un método para la conversión enzimática de naringina.

249335



Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veintiocho hojas escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 16 JUN 1959

P.A.

Alberto de Elzaburu
Por Poder

Handwritten signature of Alberto de Elzaburu.