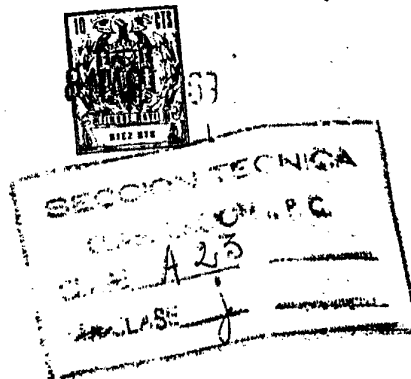


P.- 40.844

364117

B 7079 U.S. 708.516
ICB (AMS)

Memoria descriptiva



para solicitar PATENTE DE INVENCION EN ESPAÑA por 20 años

a nombre de ROHM AND HAAS COMPANY

entidad / de nacionalidad norteamericana

con domicilio en Independence Mall West, Filadelfia, Pennsylvania, Estados Unidos de América.

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR PROTEINAS PURIFICADAS A PARTIR DE UN MATERIAL PROTEINICO"

(Clase Internacional C07g A23j)

3.3.69.



Este invento se refiere a un método para preparar proteínas a partir de materiales proteínicos. Más específicamente, este invento se refiere a un método mejorado de extraer proteína a partir de dicho material proteínico. Todavía más específicamente, este invento se refiere a un procedimiento enzimático para extraer proteína desde materiales proteínicos. Todavía adicionalmente, este invento se refiere a composiciones utilizables para ello.

Proteína con buena calidad nutritiva se encuentra en pequeña cantidad en muchas zonas del mundo. Así, se efectúan esfuerzos continuamente crecientes para encontrar nuevos manantiales de dicha proteína y, al mismo tiempo, medios más eficaces para extraer y hacer disponible dicha proteína.

Los materiales proteínicos constituyen manantiales de proteína. Más particularmente, para los fines de esta solicitud, el término "materiales proteínicos" significa cualquier sustancia animal o vegetal que comprende proteínas susceptibles de ser extraídas. Típicamente, esto incluirá sustancias tales como, por ejemplo, habas de soja, judías, alfalfa, arroz, trigo, maiz, guisantes, coco, cacahuetes, linaza, semilla de algodón, semilla de colza, derivados de pescado y similares. Todos estos materiales constituyen manantiales apropiados de proteína, que puede ser utilizada en calidad de alimento o de suplementos para alimentos, tanto para seres humanos como para animales. Además, dicha proteína es también un constituyente importante en muchas aplicaciones industriales. Por ejemplo, la proteína se emplea regularmente en adhesi

30
3.3.69.



vos, recubrimientos de papel, encolado de papel, pinturas, plásticos, acabados de cuero y similares. Por lo tanto, cualquier medio mediante el cual la proteína de dichas sustancias pudiera ser aislada y hecha más fácilmente disponible, constituiría un avance importante y significativo en la técnica.

El presente invento constituye precisamente dicho avance. Más particularmente, se crean ahora nuevas composiciones enzimáticas que exhiben sustancial actividad de extracción de proteína, juntamente con un procedimiento rentable para utilizar dichas composiciones con el fin de aumentar la cantidad de proteína disponible a partir de dichos materiales proteínicos.

Entre las diversas sustancias que contienen proteína antes citadas, las habas de soja son manantiales especialmente deseables de proteína. Sin embargo, tal como es común con la mayor parte de dichos materiales, con el fin de hacer más útil la proteína de ellos, ésta deberá ser separada de la porción no proteínica de los mismos. En habas de soja los constituyentes no proteínicos pueden constituir hasta 60% del peso total de la soja. No obstante, como las habas de soja pueden ser hechas crecer con facilidad bajo condiciones de tierra relativamente malas y con rendimientos razonablemente altos, proporcionan un manantial extremadamente valioso de material proteínico. Consiguientemente, se han desarrollado numerosos procedimientos comerciales para extraer proteína a partir de la soja y derivados de soja. Por "derivados de soja" se entiende cualquier composición, solución, emulsión, composición de materia tanto con todo su contenido

30
3.3.69.



de grasa como desengrasada, y similares, que posee protei
na disponible en cualquier grado y en que dicha proteína
se ha obtenido o derivado de la soja. Los residuos proce-
dentes de la preparación de leche de soja, polvo de soja,
5 harina de soja, tortas de soja, escamas de soja, con todo
su contenido de grasas o desengrasadas, o similares, son
derivados de soja típicos.

Tal como se ha indicado anteriormente, exis-
ten numerosos medios, comerciales y de otro tipo, para
10 extraer proteína a partir de la soja y derivados de soja.
Sin embargo, en su mayor parte, estos procedimientos es-
tán limitados generalmente a obtener rendimientos de sola-
mente 40 a 60% de la proteína disponible. Correspondien-
tamente, el presente invento crea un método con el cual
15 el rendimiento de proteína procedente de materiales pro-
teínicos, y especialmente de soja y derivados de soja, pue-
de ser aumentado en 10 a 35% o más. Por lo tanto, utili-
zando el presente invento, se obtienen con facilidad ren-
dimientos de proteína de 95% o mayores.

20 Rendimientos de proteína aumentados de acuer-
do con este invento se obtienen poniendo en contacto un
material proteínico con una Extractasa A-2 en un nivel de
concentración que es eficaz para extraer proteína desde
dicho material.

25 Por "Extractasa A-2" se entiende un preparado
de enzimas bacterianas capaz de efectuar un aumento de la
cantidad de proteína que será separada desde un material
proteínico. Dicho preparado de enzimas está caracterizado
además por ser: (a) soluble en agua; (b) no dializable;
30 c) precipitado a partir de una solución acuosa del mismo

30
3.3.69.



por la adición de sulfato de amonio o de alcohol; (d) derivado de un organismo bacteriano, y (e) capaz de extraer una mayor cantidad de proteína a partir de un material proteínico, cuando se compara con la cantidad de proteína que se obtendría bajo condiciones similares por una sola extracción acuosa.

Para los fines de esta solicitud, la actividad de extracción de proteína de una Extractasa A-2 se expresará en unidades de Extractasa A-2. Una unidad de Extractasa A-2 es el peso de preparado de enzima que liberará 1,0 g de proteína precipitada isoelectricamente por 100 g de escamas de soja desengrasadas por encima de la cantidad de proteína obtenida por una extracción acuosa sin enzimas. Dicha determinación de actividad de extracción de proteína puede ser representada por la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades de Extractasa A-2/g} = \frac{\text{Peso en g de proteína procedente de una extracción con enzimas} - \text{Peso en g de proteína procedente de una extracción acuosa}}{\text{Peso en g de preparado de enzima empleado.}}$$

Usualmente, y preferiblemente, dichos preparados de enzima se derivan de cultivos de Bacillus, incluyendo las diversas cepas y mutantes de éstos. Algunos miembros típicos del género Bacillus incluyen por ejemplo: B. subtilis, B. mycoides, B. amyloliquifaciens, B. cereus, B. macerans, B. megaterium, B. sphaericus, B. circulans y similares.

Un organismo particularmente preferible para la producción de Extractasa A-2 es Bacillus subtilis. Es

30
3.3.69.



hecho crecer con facilidad y produce un preparado de enzi
 ma que tiene un alto grado de actividad de extracción de
 proteína. Además, numerosas cepas de este organismo están
 fácilmente disponibles para el público; es decir, pueden
 5 obtenerse a partir de muchos depositarios de cultivos re-
 conocidos, universidades, y similares. B. subtilis, junta
 mente con los otros organismos capaces de producir Extrac
 tasa A-2, son hechos crecer generalmente en un líquido su
 mergido o en un cultivo superficial sobre un medio que com
 10 prende un manantial de energía utilizable, carbono y ni-
 trógeno asimilables. Desde luego, cualquiera de los facto
 res de crecimiento y sales minerales regularmente emplea-
 dos o sus combinaciones, pueden ser incorporados también
 en dichos medios de cultivo.

15 Típicamente, dichos medios pueden incluir el
 Caldo Nutriente Difco bien conocido, así como mezclas que
 contienen sacarosa, dextrosa, maltosa, fécula de maíz, ha
 rina de soja, gelatina, carne, huesos, desperdicios de
 pescado, sangre, fosfato monosódico, fosfato monoamónico,
 20 sulfato de magnesio, carbonato de calcio, melazas forti-
 ficadas con nutrientes de alto contenido proteínico y si-
 milares. Aunque la fécula de maíz y la harina de soja u
 otros derivados de soja que contienen proteínas son cons-
 tituyentes especialmente deseables de los medios de culti
 25 vo, se pueden utilizar similarmente otras numerosas sus-
 tancias que contienen proteína, tales como por ejemplo ha-
 rina de maíz, harina de semilla de colza, guisantes y si-
 milares. Un medio sumergido líquido particularmente efi-
 caz comprenderá 0,5 a 6,0% de gelatina, 5 a 15% de fécula
 de maíz, 0,1 a 1,0% de fosfato monoamónico y 0,2 a 0,6%

30
 3.3.69.



de carbonato de calcio.

Un medio preferible comprenderá 2 a 4% de gelatina, 8 a 10% de fécula de maiz, 0,3 a 0,6% de fosfato monoamónico y 0,4 a 0,5% de carbonato de calcio.

5 Sales tales como fosfato monosódico, potásico o amónico y similares son incorporadas usualmente en dichos medios de cultivo en la cantidad de 0,001 a 5%, y preferiblemente de 0,1 a 2%, en peso del medio total. Estas sales son ventajosas para evitar un aumento rápido de
10 pH durante el crecimiento del organismo. Este control de pH aumenta en cierto grado la producción rápida de un preparado de enzima que tiene una actividad de extracción de proteína relativamente alta. Similarmente, la adición de carbohidratos evitará también un aumento excesivo de pH
15 durante la producción de enzimas. Los carbohidratos estarán típicamente en la forma de melazas, almidón, almidón ácido o enzimáticamente modificado, dextrosa, sacarosa o sus combinaciones.

Se puede permitir una libertad o amplitud sustancial con respecto al margen de pH del medio de cultivo
20 durante la producción de enzima. Sin embargo, se ha encontrado que se obtendrán preparados de enzima que poseen niveles relativamente altos de actividad de extracción de proteína cuando el pH del cultivo se ha mantenido durante
25 el crecimiento del organismo dentro del margen de 4,5 a 8,5 y preferiblemente de 5,5 a 7,5.

Similarmente, rendimientos óptimos de Extrac-
tasa A-2 necesitan que el cultivo de crecimiento sea mantenido a una temperatura dentro del margen de 20 a 35°C y preferiblemente dentro del margen de 30 a 35°C. Sin embar-

30
3.3.69.



1969

go, tal como se ha indicado anteriormente, se permitirán variaciones, pero el rendimiento y la actividad de enzimas así obtenidas pueden ser afectados desfavorablemente o deletéreamente.

5 La producción máxima de enzimas se obtendrá dentro del espacio de 48 a 96 horas, dependiendo, desde luego, de factores tales como los organismos particulares que son hechos crecer, la concentración total de sólidos nutrientes, el pH, la temperatura, la ventilación o aireación, la agitación, y similares. Sin embargo, bajo las

10 condiciones preferidas aquí indicadas, el ciclo de crecimiento puede ser reducido a 18 horas o incluso menos. El mantenimiento del organismo bajo las condiciones aquí descritas durante períodos de tiempo superiores a 96 horas

15 no será generalmente perjudicial. Sin embargo, casi siempre es económicamente preferible cosechar los preparados de enzima tan pronto sea posible después de completarse el ciclo de producción. Cualquiera de las metodologías que se encuentren dentro del conocimiento de los técnicos

20 en la materia puede utilizarse para determinar cuando está completo el ciclo de producción. Cuando se desea, la actividad de extracción de proteína del cultivo crudo puede ser determinada en unidades de Extractasa A-2 a intervalos regulares por los medios anteriormente descritos.

25 La cosecha de la enzima deberá realizarse cuando la actividad de extracción de proteína ha alcanzado esencialmente su máximo o un valor cercano.

 En general, el crecimiento de los organismos en cuestión sobre un cultivo superficial necesitará esencialmente las mismas condiciones de temperatura y pH indi

30
3.3.69.



5 cadas para cultivos sumergidos líquidos. Sin embargo, el medio utilizado en un cultivo superficial diferirá usualmente algo del de un cultivo sumergido líquido. Por ejemplo, un medio preferido comprenderá escamas de soja desengrasadas, fécula de maíz y agua. Desde luego, extractos acuosos de este medio de cultivo superficial después del crecimiento del organismo exhibirán actividad de extracción de proteína.

10 Se dispone de numerosos procedimientos, y estos pueden ser empleados con facilidad, para la concentración de los preparados de enzima a partir del cultivo crudo después de completarse el ciclo de crecimiento. Típicamente, dichos métodos de concentración incluirán la eliminación de agua desde los cultivos totales o cultivos crudos filtrados, por secado por pulverización, concentración en vacío, liofilización o secado sobre un vehículo inerte tal como lactosa, sales inorgánicas, tierra de diatomeas, sus combinaciones y similares. Alternativamente, los preparados de enzima en consideración pueden ser precipitados con alcohol y sulfato amónico. Este último procedimiento dará como resultado generalmente productos que tienen un grado de pureza relativamente alto que puede ser acentuado incluso más realizando dicha precipitación bajo condiciones de refrigeración. A causa de que

15

20

25

30 los preparados de enzima aquí descritos pueden ser utilizados en una gran extensión en la producción de alimentos o materiales de tipo alimenticio, esta purificación aumentada será algo más deseable. Desde luego, la separación de los preparados de enzima desde el cultivo crudo no es absolutamente necesaria, ya que estos pueden ser emplea

30
3.3.69.



dos eficazmente en esta forma. La separación y el grado de purificación dependerán en un alto grado de la utilización para la que se han de aplicar los preparados de enzima.

5 Las composiciones que comprenden Extractasa A-2 se preparan usualmente combinando dichos preparados de enzima con vehículos inertes o sustancialmente inertes. Por "vehículo" se entiende cualquier sustancia o combinación de sustancias que pueda utilizarse para disolver, di
10 luir, suministrar, diseminar o difundir el preparado de enzima sin perjudicar sustancialmente su eficacia. La can tidad de preparado de enzima combinado con un vehículo en cualquier composición variará con la concentración deseada de actividad de extracción de proteína. Generalmente,
15 dichas composiciones comprenderán Extractasa A-2 en el margen de 1 a 99%, y preferiblemente de 5 a 25%, en peso de la composición total.

Una composición típica de acuerdo con este in
20 vento será preparada precipitando Extractasa A-2 con alcohol a partir de un cultivo crudo obtenido tal como se describe anteriormente. Este precipitado, es decir la Extractasa A-2, es incorporado a continuación en lactosa para constituir 10% del peso total de dicha composición. Esta composición enzimática es utilizada después con fa
25 cilidad para extraer proteína desde materiales proteínicos, tales como, por ejemplo, escamas de soja desengrasadas.

Tal como se ha indicado anteriormente, el pro
30 cedimiento de este invento comprende poner en contacto un material proteínico con Extractasa A-2 en una cantidad

30
3.3.69.



que es eficaz para extraer desde ella la proteína. De forma general y preferible, este procedimiento se llevará a cabo en una solución acuosa. La cantidad de agua utilizada en dicha solución variará, desde luego, con los substratos que han de ser tratados, es decir con el material proteínico. En la mayor parte de los casos, se empleará una cantidad mínima de agua, es decir solamente la cantidad que sea suficiente para solubilizar completamente toda la proteína de la sustancia que ha de ser tratada.

5

10

Usualmente, esta variará, sobre una base en peso, desde 5 a 30 partes de agua por 1 parte de material proteínico. Una proporción preferible de agua a material proteínico será de 10 a 1, respectivamente.

15

20

La cantidad de Extractasa A-2 empleada en el procedimiento de este invento variará, desde luego, no solamente con su actividad de extracción de proteína de esta, sino también con el material proteínico que ha de ser tratado, además de las condiciones de tratamiento relacionadas. Se ha encontrado que por cada gramo de material proteínico, se utilizarán aproximadamente 0,01 a 300, y preferiblemente 0,1 a 50, unidades de Extractasa A-2 de preparado de enzima, para extraer la proteína desde aquel. Sin embargo, dependiendo de las diversas condiciones de tratamiento, etc. puede ser posible utilizar menos de 0,01 unidades Extractasa A-2 de preparado de enzima por gramo de material proteínico. Similarmente, en algunos casos, puede requerir más de 300 unidades Extractasa A-2 para extraer la proteína deseada. La determinación de la cantidad exacta de Extractasa A-2 requerida bajo cualesquiera condiciones dadas se encuentra, desde luego,

25

30
3.3.69.



1391

dentro de los conocimientos de un técnico en la materia.

En general, el procedimiento en cuestión se lleva a cabo a un pH dentro del margen de aproximadamente 4,8 a 8,8, y preferiblemente dentro del margen de aproximadamente 6,5 a 7,5. Dependiendo del material proteínico que está siendo tratado y de hechos similares, se pueden incorporar en él diversas sustancias para ajustar y mantener el pH. Típicamente, estas incluirán sulfato de amonio, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, carbonato de sodio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido láctico, ácido adípico y similares. También es muy deseable mantener la solución acuosa de material proteínico mientras está en contacto con el preparado de enzima a una temperatura dentro del margen de aproximadamente 20 a 60°C y preferiblemente de aproximadamente 30 a 40°C. Usualmente, el procedimiento de extracción avanzará más rápidamente a las temperaturas superiores y bajo suave agitación. Sin embargo, el tiempo necesario para cualquier extracción de proteína particular por medio del procedimiento aquí descrito variará, desde luego, con el material proteínico, con la concentración de enzima y con las otras condiciones aquí indicadas. Para la mayor parte de los casos, una extracción de proteína satisfactoria necesitará al menos 5 minutos y generalmente hasta una hora o más. Bajo condiciones preferibles, la extracción de proteína se realizará dentro de 15 a 30 minutos.

Cuando se desea, la extracción de enzimas antes descrita puede ser seguida por una segunda operación. Más específicamente, después de una extracción inicial de proteína a un pH dentro del margen de 4,8 a 8,8, la solución

30
3.3.69.



ción de material proteínico es ajustada a un pH de 9 o superior y es mantenida en este estado hasta que se completa la extracción adicional de proteína. Esto requerirá usualmente aproximadamente la misma cantidad de tiempo que la extracción enzimática inicial. El ajuste del pH en esta segunda etapa se logra mediante materiales causticos, amoníaco acuoso, tampones alcalinos tales como fosfato de potasio dibásico, y similares.

Después de completar el procedimiento de extracción, lo cual puede determinarse por análisis de proteína de acuerdo con el método de Kjeldahl, la proteína puede ser recuperada por cualquiera de los medios conocidos para los técnicos en la materia. Para la mayor parte de los casos, esto implicará precipitación de la proteína ajustando la solución con ácidos comestibles hasta el punto isoelectrico de la proteína. Por ejemplo, la proteína de soja puede ser precipitada isoelectricamente a un pH de aproximadamente 4,5 a 4,6. Los ácidos láctico y acético son ácidos comestibles especialmente útiles para disminuir el pH hasta este nivel. Otros medios de aislar la proteína incluyen filtración, centrifugación, secado por pulverización, liofilización, decantación, destilación y similares. Desde luego, los medios particulares escogidos dependerán en un alto grado de la utilidad deseada para el producto final.

Tal como se ha indicado anteriormente, el procedimiento de este invento está adaptado especialmente para extraer proteína a partir de escamas de soja, y particularmente de escamas de soja desengrasadas. Dichas escamas de haba de soja son considerables manantiales de pro-

30
3.3.69.



teína. Además, son preparadas con facilidad y, en efecto, están disponibles regularmente como artículo comercial en esta forma particular. Generalmente, las escamas de soja se obtienen convirtiendo en escamas la soja después que ésta ha sido descascarada, pero antes de que ha sido seca. Las escamas desengrasadas son preparadas de la misma manera general excepto que las escamas son tostadas y después el aceite es eliminado por extracción con hexano. Todos dichos tratamientos de soja son, desde luego, bien conocidos para los técnicos en la materia.

Similarmente, este invento es también muy apropiado para la recuperación de proteína desde el residuo sólido que contiene proteína durante la producción de leche de soja. Generalmente, la leche de soja se obtiene impregnando en agua soja cruda entera durante la noche, escurriendo y después descascarando. La soja descascarada es después triturada, extraída con agua, y filtrada, dando como resultado una leche de soja con el contenido total de grasas, que contiene aproximadamente 60 a 70% de la proteína disponible. El residuo que contiene proteína que resulta de esto puede ser tratado después por el procedimiento de este invento para extraer adicionalmente mucha cantidad de la proteína insolubilizada que queda en él. En ocasiones, la leche de soja será producida por la extracción acuosa de proteína a partir de soja o incluso a partir de escamas de soja que no han sido trituradas. No obstante, la proteína en el residuo resultante puede ser extraída de acuerdo con el procedimiento de este invento en cualquier momento durante la preparación de la leche de soja.

30
3.3.69.



Para una comprensión más completa de este invento y de alguna de sus realizaciones, se ofrecen los siguientes ejemplos a título de ilustración y no a título de limitación.

5

EJEMPLO 1

Producción sumergida de Extractasa A-2 en matraces de agitación.

10

Porciones alicuotas de 100 ml de un medio acuoso compuesto por 2% de gelatina, 10% de fécula de maíz, 0,4% de fosfato monoamónico, y 0,4% de carbonato de calcio son añadidas a matraces Erlenmeyer de cuello ancho de un litro que son tapados con 3 discos de filtro para suspensión o leche.

15

Después de esterilización del medio a 1,05 kg/cm² manométricos durante 30 minutos, los matraces son enfriados e inoculados hasta una concentración final de 2% con una suspensión acuosa preparada a partir de un cultivo de Bacillus subtilis hecho crecer en un Agar Nutriente Difco durante 18 horas. Después, los matraces son incubados sobre un agitador que gira a 260 rpm. con una excéntrica de 57 mm a 35-37°C con una humedad relativa de 50%. El pH inicial es de 7,0. Después de 72 horas, los cultivos son retirados del agitador y son ensayados en cuanto a actividad de extracción de proteína. Esto se logra de la siguiente manera:

20

25

100 g de escamas de soja desengrasadas son colocados en 1000 ml de agua corriente. A esta solución se añaden 1,0 g de todo el cultivo antes preparado. Se deja realizar la reacción durante 30 minutos a un pH de 6,8 a 40°C, mezclando en un agitador que oscila a 275 rpm. por

30

3.3.69.



una amplitud de 13 mm. De una manera similar, se prepara una solución de escamas de soja desengrasada y agua, pero sin la adición de todo el cultivo. Esta solución es sometida a continuación a las mismas condiciones, es decir, durante 30 minutos a pH 6,8 a 40°C, con mezclado. Después de esto, el residuo insoluble procedente de ambas soluciones es eliminado por filtración a través de un tamiz de malla 100. El filtrado ajustado a pH 4,5 con ácido láctico (al 85%) y es centrifugado. La proteína precipitada es secada y pesada y la actividad de extracción de proteína del preparado de enzimas de Extractasa A-2, es decir todo el cultivo, es calculada en unidades de Extractasa A-2.

Cálculo de la actividad de extracción de proteína en unidades de Extractasa A-2

15	Peso de proteína de soja isoelectrica procedente de extracción acuosa de enzimas	27 g
	Peso de proteína de soja isoelectrica procedente de extracción con agua	22 g
	Diferencia	5 g.

20

$$\text{Unidades de Extractasa A-2/g} = \frac{\text{diferencia de peso}}{\text{peso de preparado de enzimas}} = \frac{5}{1,0} = 5,0$$

25 Por lo tanto, el cultivo total de Extractasa A-2 tiene una actividad de extracción de proteína de 50 unidades Extractasa A-2.

30 Un concentrado de Extractasa A-2 se prepara por precipitación con alcohol. La concentración se logra añadiendo, con mezclado constante, 3 volúmenes de etanol a 40°C al cultivo total antes descrito. Correspondientemente

3.3.69.



te, el concentrado de Extractasa A-2 es precipitado desde éste. A continuación es recogido por filtración y secado en vacío a 30-35°C lo cual lo hace apropiado para almacenar y utilizar.

5

EJEMPLO 2

En 1000 ml de agua corriente se colocan 100 g de escamas de soja desengrasada. A esta solución se añaden 0,1 g del concentrado precipitado con alcohol de Extractasa A-2 que se ha preparado en el Ejemplo 1. Esta solución es mantenida después durante 15 minutos a pH 6,8, a 40°C, con mezclado en un agitador que oscila a 275 rpm a lo largo de una amplitud de 13 mm. Inmediatamente después de esto, la mezcla de reacción es ajustada a pH 9 con NaOH 5 N y es hecha reaccionar adicionalmente durante 15 minutos. Después de la reacción, el residuo insoluble es eliminado por filtración a través de un tamiz de malla 100. El filtrado es ajustado a pH 4,5, con ácido láctico (al 85%) para precipitar la proteína. Después de centrifugar, la proteína es secada y pesada. La proteína así obtenida es comparada con la cantidad derivada de una muestra testigo que es preparada y hecha reaccionar similarmente pero sin la adición de la Extractasa A-2.

15

20

25

Peso de proteína isoeléctrica obtenida utilizando preparados de enzima	37 gramos
Peso de proteína isoeléctrica obtenida sin utilizar preparado de enzima	23 gramos

EJEMPLO 3

En 1000 ml de agua se suspenden 100 g de soja con el contenido total de grasas, que son triturados para que pasen por un tamiz de malla 20. A esta solución se

30

3.3.69.



añade 1 g del concentrado precipitado con alcohol de Extractasa A-2 preparado en el Ejemplo 1. Después de añadir este preparado de enzima, la solución es mantenida durante 2 horas a 37°C y a un pH de 6,8 con suave agitación.

5 Después de esto, la solución es filtrada a través de estopa de algodón para eliminar cualesquiera residuos insolubles. El filtrado obtenido de esto es analizado en cuanto a proteína por el método de Kjeldahl. La cantidad de proteína obtenida por este procedimiento es comparada con la
10 obtenida por un ensayo testigo que emplea las mismas condiciones excepto que no se incorpora en él la Extractasa A-2.

	Peso de proteína obtenida utilizando Extractasa A-2	26,9 g
15	Peso de proteína obtenida sin utilizar Extractasa A-2	17,5 g

EJEMPLO 4

En 1000 ml de agua corriente, se introducen 100 g de escamas de soja desengrasada. A esta solución se
20 añade 1,0 g de la Extractasa A-2 preparada en el Ejemplo 1. Esto se hace reaccionar durante 30 minutos a un pH de 6,8 a 40°C, con suave agitación. Después de esto, la solución es filtrada a través de una estopa de algodón para eliminar desde ella el residuo insoluble. Este residuo
25 insoluble, que asciende a 32 g, es introducido a continuación en 100 ml de agua a los que se añade 1,0 g del concentrado de Extractasa A-2 preparado de acuerdo con el Ejemplo 1. Esta solución es mantenida a 40°C durante 30 minutos a un pH de 6,8. Nuevamente, el residuo insoluble
30 es filtrado con estopa de algodón y el filtrado obtenido

30
3.3.69.



desde esto es ajustado con ácido láctico a un pH de 4,5 para precipitar la proteína isoeléctrica. De esta manera, se obtienen 6,36 g de proteína isoeléctrica a partir del residuo, lo cual se ha de comparar con 5,7 g de proteína obtenida cuando dicho residuo es tratado con agua bajo condiciones similares pero sin la presencia de Extractasa A-2.

EJEMPLO 5

De una manera similar al Ejemplo 1, matraces Erlenmeyer de cuello ancho de 1 litro separados que contienen Caldo Nutriente Difco son inoculados con cultivos de los siguientes organismos: Bacillus subtilis, Bacillus mycoides, y Bacillus megaterium. Estos matraces son incubados a continuación durante 66 horas en un agitador que gira a 260 rpm con una excéntrica de 57 mm a 35-37°C con una humedad relativa de 50%. Después de esto, los cultivos totales son retirados del agitador y ensayados en cuanto a actividad de extracción de proteína, tal como se indica en el Ejemplo 1. Los resultados de esto están indicados en la siguiente Tabla.

<u>Organismo</u>	<u>Unidades de Extractasa A-2/g</u>
<u>Bacillus subtilis</u>	16
<u>Bacillus mycoides</u>	17
<u>Bacillus megaterium</u>	26

La presente solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 27 de Febrero de 1.968, bajo el número 708.516, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



169

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

- 5 1.- Un procedimiento para preparar proteínas purificadas a partir de un material proteínico, caracterizado por poner en contacto dicho material proteínico con un preparado de enzima en una cantidad que es eficaz para extraer proteína desde dicho material en que dicho preparado de enzima es: a) soluble en agua; b) no dializable;
- 10 c) susceptible de ser precipitado a partir de una solución acuosa del mismo por la adición de sulfato de amonio o de alcohol; d) se deriva de un organismo bacteriano, y e) es capaz de extraer una cantidad mayor de proteínas desde un material proteínico cuando se compara con la cantidad de proteínas que se obtendría bajo condiciones similares por una sola extracción acuosa.
- 15 2.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque dicho procedimiento se lleva a cabo en una solución acuosa.
- 20 3.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque dicha solución acuosa comprende, en peso, 5 a 30 partes de agua por 1 parte de material proteínico.
- 25 4.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque

3.3.69.



dicho preparado de enzima tiene una actividad de extracción de proteína dentro del margen de 0,01 a 300 unidades de Extractasa A-2 por gramo.

5 5.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 caracterizado porque dicho preparado de enzima tiene una actividad de extracción de proteína dentro del margen de 0,1 a 50 unidades de Extractasa A-2 por gramo.

10 6.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 caracterizado porque dicho preparado de enzima se deriva de un Bacillus.

15 7.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 caracterizado porque dicho Bacillus está seleccionado del grupo que consiste en Bacillus subtilis, Bacillus mycoides, Bacillus amylolicuifaciens, Bacillus cereus, Bacillus macerans, Bacillus megaterium, Bacillus sphaericus y Bacillus circulans.

20 8.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 caracterizado porque dicho procedimiento se lleva a cabo en un pH dentro del margen de aproximadamente 4,8 a 8,8 y a una temperatura dentro del margen de aproximadamente 20 a 60°C.

25 9.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 caracterizado porque dicho pH es mantenido dentro del margen de aproximadamente 6,5 a 7,5 y dicha temperatura es mantenida dentro del margen de aproximadamente 30 a 40°C.

30 10.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9 caracterizado porque el pH es ajustado subsiguientemente a 9 o valor superior.

11.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera

30
3.3.69.



quiera de las reivindicaciones 1 a 9 caracterizado porque dicho material proteínico está seleccionado del grupo que consiste en soja y derivados de soja.

5 12.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11 caracterizado porque dicho derivado de soja es escamas de soja desengrasada.

10 13.- Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 caracterizado porque dicho preparado de enzima es combinado con un vehículo para constituir una composición.

14.- Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13 caracterizado porque dicho preparado de enzima comprende 5 a 25% en peso de dicha composición.

15 15.- Un procedimiento para preparar proteínas purificadas a partir de un material proteínico.

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

Esta Memoria consta de veintidós hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 8 MAR. 1969

F. A.
Alfredo La Cerna
Gen. P. 1969

G.D.S.
3.3.69.