

389894

389894



SECCION I	CLASIFICACION
CLASIFICACION I.P.A.	
CLASIFICACION	207
ESTADO	C

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE MEZCLAS DE L-AMINOACIDOS NATURALES", a favor de la firma italiana ISTITUTO DI RICERCHE BIOMEDICHE ANTOINE MARXER S.p.A., residente en Loranzé d'Ivrea (Turín) ITALIA.

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a la preparación de mezclas de aminoácidos naturales a partir de materiales proteínicos, en particular, aunque no exclusivamente, a partir de proteínas de origen animal, por hidrólisis ácida de dichos materiales en un medio acuoso que contenga como agente hidrolizante un ácido mineral.

5.

Un objeto del invento es proporcionar un procedimiento industrial que permite el uso de diversos materiales proteínicos de asequibilidad normal, especialmente materiales que de otro modo no se utilizarían (como, por ejemplo,

10.

75

389894



los numerosos productos secundarios o de desecho de las industrias del pescado, de la carne y similares), para obtener de ellos mezclas de aminoácidos naturales en forma L, aptos por ejemplo para complementar los alimentos para la ganadería

5. o para cualquier otro fin industrial. Otro objeto de este invento es proporcionar un procedimiento capaz de suministrar, como producto final, una mezcla de L-aminoácidos que en la mayor extensión posible conserve las proporciones existentes en el material original, fundamentalmente entre los aminoácidos individuales; de modo, por ejemplo, que dicha mezcla pueda luego ser plenamente asimilada por el animal al que se administre. Otros objetos y ventajas de este invento se irán haciendo manifiesto a medida que progrese la descripción que sigue.

15. Según el invento, el hidrolizado filtrado, que contiene el ácido mineral de hidrólisis y los aminoácidos, se diluye con agua y, sin separación previa ni neutralización del ácido mineral, se pone en contacto de cambio iónica con una resina catiónica del tipo de ácido sulfónico, después de lo
20. cual los aminoácidos fijados por la resina se eluyen con una solución acuosa de amoníaco que tenga una concentración no superior a 2,55% en peso de NH_3 (o de NH_4OH 1,5-n) y se descarga del eluato el amoníaco por evaporación a presión baja. La solución acuosa de aminoácidos así obtenida se elabora
25. luego según el uso a que se destine. Dado que la hidrólisis ácida destruye el triptófano, habrá necesidad de reintegrar este aminoácido a la mezcla de aminoácidos obtenida (cuando hayan de mantenerse las proporciones esenciales).



1964

En su forma más completa, el procedimiento puede representarse así:

- (I) - hidrólisis ácida
- (II) - filtración
5. (III) - dilución
- (IV) - cambio iónico
- (V) - elución
- (VI) - decoloración
- (VII) - filtración
10. (VIII) - descarga del NH_3 y concentración
- (IX) - secado por nebulización.

El material proteínico sometido a la hidrólisis ácida puede ser de cualquier tipo apropiado, como, por ejemplo, harina de soja, proteína de soja, sangre desecada en polvo, carne desecada en polvo, hígado y/o órganos de animales en general, despojos frescos, desechos de pescado frescos, pescado fresco, cuernos y pezuñas desecados y en polvo, plumas, albúmina de huevo, caseína, albúmina de leche, etc.

La hidrólisis se lleva a cabo preferentemente con ácido sulfúrico acuoso, aunque también es posible utilizar ácido clorhídrico acuoso. La cantidad de agua en el medio de hidrólisis (incluyendo la contenida en el material de partida) es preferentemente tal que la concentración de ácido, calculado como H_2SO_4 , sea de 10 a 40% y preferentemente de 20% a 40% en peso. Actuando con presión, la concentración del ácido puede incluso descender hasta el 5% en peso. El tiempo, la concentración de ácido y la temperatura de hidrólisis depende del tipo de cadena proteínica que haya de hidrolizarse y se eligen



de modo que se obtenga en el hidrolizado filtrado una relación no inferior a 0,85 entre el aminonitrógeno (según Soerensen) y el nitrógeno total (según Kjeldahl).

EJEMPLO 1

5. En un matraz de vidrio de 200 litros de capacidad, caldeado eléctricamente y provisto de agitador, refrigerador de gravedad, boca de llenado y tapón de vaciado en el fondo, se depositaron 60 litros de agua, 20 litros de H_2SO_4 de gravedad específica 1,84 (96%) y 30 kg de harina de pescado que
10. tenía los datos analíticos típicos siguientes (en peso):

	contenido de humedad	5 - 7%
	proteína	63 - 72%
	lípidos	5 - 12%
	cenizas	10 - 23%
15.	extractos desnitrogenados	3 - 4%
	fibra bruta	0%.

- Se puso la mezcla en ebullición (109°C) por 20 a 24 horas y después del enfriamiento se filtró el hidrolizado en vacío en un filtro de cajetín, con lo que se obtuvieron alrededor de 80 litros de filtrado ácido.
- 20.

La hidrólisis puede efectuarse también en una autoclave esmaltada provista de agitador. A presión de 1,8 a 2 atmósferas (temperatura de ebullición, 130 a 133°C), el tiempo necesario para la hidrólisis es de unas 3 horas.

25. Como se ha expuesto antes, el hidrolizado ácido filtrado se pasa al cambio iónico sin eliminación previa ni neutralización del ácido mineral utilizado para la hidrólisis. No obstante, se le diluye apropiadamente con agua desionizada, ya



sea para rebajar su densidad a menos de la resina cambiadora de iones, ya sea para establecer condiciones particulares de cambio, según se expone a continuación. En términos generales, teniendo en cuenta la concentración típica del ácido (20 a 5. 40%) en el medio de hidrólisis, el rendimiento del cambio iónico se mantiene a niveles óptimos si el hidrolizado filtrado se diluye en 2 a unos 20 veces su volumen inicial.

La resina catiónica es de preferencia una resina de sulfonato-poliestireno con 8% aproximadamente de enlace de 10. reticulación divinilbencénicos, como, por ejemplo, Amberlite IR 120, Kastel C 300 o Nalcite HCR, y en la práctica se usa típicamente en una columna de percolación. El porcentaje de reticulación en la resina puede variar respecto al nivel mencionado antes, para reforzar o por el contrario, en la fase de 15. percolación con el hidrolizado diluido "distraer", de la columna aminoácidos específicos, deseablemente con el fin de regular la composición final de la mezcla de aminoácidos obtenida. Como se verá más adelante, la resina puede usarse en la forma ácida fuerte (regenerada con HCl) o en la forma amónica. Indiferentemente del grado de dilución, la rapidez de 20. percolación se mantiene en un intervalo de 0,6 a 1,0 litros de hidrolizado filtrado diluido por hora y por litro de resina. De preferencia se usa un litro de resina en la columna para fijar de 100 a 150 g de aminoácidos libres presentes en el 25. hidrolizado.

En las condiciones del procedimiento, el ácido sulfúrico y los productos de desaminación (formados durante la hidrólisis no son retenidos por la resina, mientras que de otro

6-389894



- lado los productos de degradación formados por descarboxilación (éstos también originados durante la hidrólisis) y los productos básicos son fijados por la resina junto con los aminoácidos, pero no son sucesivamente eluidos de ella si la concentración del eluyente amoniacal es inferior a 2,55% en peso de NH_3 . De preferencia, sin embargo, esta concentración no es inferior a 1,7% de NH_3 .

EJEMPLO 2

- Se usa una columna con 32 cm de diámetro interno y 3 m de altura, que contiene 160 litros de resina en forma ácida; el lecho de resina tiene 2 m de altura. Los 80 litros de hidrolizado según el Ejemplo 1 se incrementan hasta 1600 litros con agua desionizada (dilución, 1:20) y la solución se percuela por la columna a la velocidad de 2 litros/minuto (igual a 1,75 litros/hora por litro de resina). Al cabo de 800 minutos, se bombea agua desionizada por la columna durante 50 minutos, a la velocidad de 2 litros/minuto, para arrastrar el hidrolizado que ha quedado en la columna. Por último, se pasan por ella en dirección opuesta 100 litros de agua desionizada (a la velocidad de 2 litros/minuto), para eliminar todos los vestigios de materia en partículas retenida en la superficie del lecho de resina o para restaurar el propio lecho, puesto que éste puede haber quedado perturbado por el hinchamiento de los granulos de resina en la fase del cambio iónico con el hidrolizado.

25. EJEMPLO 3

Se adopta el mismo procedimiento que en el Ejemplo 2, pero utilizando 80 litros de hidrolizado que se aumentan hasta 160 litros por medio de agua desionizada (dilución, 1:2).



EJEMPLO 4

Se procede con la misma instalación que en el Ejemplo 2, pero usando la resina en la forma amónica. El procedimiento es el mismo que en el Ejemplo 3.

5. En cada uno de los tres ejemplos que se han descrito, los L-aminoácidos son fijados por la resina catiónica utilizada, salvo cierta detracción (difícil de evitar) que asciende a unos pocos porcentajes en el caso de los Ejemplos 3 y 4 y es algo mayor (6 a 7%) en el caso del Ejemplo 2 (en el cual el hidrolizado se diluyó considerablemente). En el ejemplo 2
10. mostraron particular tendencia a la detracción los ácidos glutámico y espártico, probablemente a causa de su mayor acidez respecto a los otros aminoácidos contenidos en el hidrolizado. Por consiguiente, parece preferible actuar con diluciones bastante modeñadas, que no excedan de 10:1 aproximadamente, salvo cuando sea deseable, para equilibrar la mezcla final de aminoácidos que hayan de obtenerse, cierta detracción de los
15. dos ácidos mencionados antes. En los casos en que, por la naturaleza del material proteínico original, ésta pueda contener o producir durante la fase de hidrólisis sustancias capaces de adherirse a la resina tan intensamente que hagan necesaria la regeneración entre uno y otro ciclo, será necesario recurrir a los procedimientos que se han ilustrado en los
20. Ejemplos 2 y 3, los cuales cuidan de la regeneración ácida de la resina entre un ciclo y el siguiente.
- 25.

Los Ejemplos 2a, 3a y 4a, que siguen constituyen una continuación de los Ejemplos 2, 3 y 4, respectivamente.



EJEMPLOS 2a y 3a

5. Para eluir de la columna los aminoácidos, se prepara una solución acuosa de NH_4OH 1,5-n (2,55% en peso de NH_3) mediante burbujeo de amoníaco gaseoso a través de agua desionizada, contenida en un recipiente de acero inoxidable o de resina de poliéster y provisto de agitador. La concentración de la solución se sigue acidimétricamente.

10. Se suministra la solución amoniacal a la columna a la velocidad de 2 litros/minuto. La reacción es exotérmica y el frente térmico (que coincide con el frente de los aminoácidos eluidos por la resina) alcanza una temperatura de unos 45°C .
15. A los 90 minutos del inicio de la elución, el eluato empieza a contener cantidades apreciables de aminoácidos, y entonces se le recoge. En el minuto 165 (que corresponde a 330 litros de solución amoniacal), se reemplaza la solución por agua desionizada y se prosigue la recogida del eluato hasta el minuto 210 (90 litros de agua desionizada). Se recoge un total de 240 litros de eluato aminoácido amoniacal.

20. Luego se lava la columna en contracorriente con agua desionizada. Después de la sedimentación de la resina, se procede a regenerarla por percolación con 120 litros de ácido clorhídrico al 10% (a la velocidad de 2 litros/minuto), seguido por lavado con 120 litros de agua desionizada, a 2 litros/minuto.

25. EJEMPLO 4a

Se sigue el mismo procedimiento que en los Ejemplos 2a y 3a hasta el lavado en contracorriente con agua desionizada. En este punto, sin regeneración del ácido, la columna está

389894



lista para usarla en un nuevo ciclo (percolación con hidrolizado).

5. En cada uno de los casos que se han expuesto antes el eluato amoniacal necesita normalmente ser decolorado, lo cual puede efectuarse añadiendo carbón decolorante al eluato (240 litros). Así, por ejemplo, se añaden 3,85 kg de carbón decolorante, se agita vivamente la suspensión por 1/2 hora a lo menos y luego se filtra rápidamente. El período de agitación no debe ser demasiado prolongado, dado que el carbón de ordinario absorbe los aminoácidos aromáticos, por lo cual
10. es siempre una buena idea determinarlos de cuando en cuando según la calidad del carbón utilizado y el material que da origen a los aminoácidos.

15. La eliminación del amoníaco y la concentración del eluato se efectúan preferentemente en un concentrador ciclónico, actuando en vacío y con un serpentín calentado a unos 30°C. Del ciclón se descarga una lechada con una concentración de aminoácido de 70% en peso aproximadamente. La lechada puede usarse tal cual está o puede ser secada (de preferencia,
20. en un desecador instantáneo), después de haber determinado el título de los aminoácidos individuales y después de la posible integración con triptófano y/o otros aminoácidos y/o otras mezclas de aminoácidos, obtenidos de la manera que aquí se ha descrito pero a partir de proteínas diferentes, según
25. la composición final requerida para el uso a que se destine la mezcla en cuestión. La cantidad de L-aminoácidos obtenibles en cada ciclo del procedimiento que aquí se ha descrito asciende a 50-55% aproximadamente de la cantidad obtenible en teoría a partir del material de partida. La tabla que sigue ilustra los resultados obtenidos con diversos materiales proteínicos de partida.



Materiales proteínicos sometidos a hidrólisis

	Composición porcentual de las mezclas de aminoácidos	Harina de <u>aren</u> que	Plumas	Albúmina de huevo	Harina de carne	Harina de hí-gado	Harina de so-ja
5.	Acido aspár-tico	8.9	6.8	10	8.1	7.1	11.1
	Treonina	4.0	4.6	4.1	4.0	3.4	3.4
	Serina	3.8	9.1	5.9	6.7	3.6	4.7
	Acido glu-támico	13.8	9.5	13.7	15.1	13.0	17.5
10.	Prolina	4.8	13.9	4.1	11.8	7.4	5.6
	Glicina	6.9	8.6	4.3	14.0	7.1	4.8
	Alanina	7.9	5.1	7.6	8.6	7.6	4.9
	Cisteina	/	8.5	1.4	/	1.1	/
	Valina	5.5	9.3	7.2	4.8	6.6	3.7
15.	Metionina	3.9	/	4.6	1.8	3.1	1.1
	Isoleucina	4.7	5.9	5.7	3.1	5.2	3.2
	Leucina	9.4	10.2	10.1	7.4	12.0	7.3
	Tirosina	2.9	1.6	2.6	1.4	1.2	1.0
	Fenilalanina	3.7	2.3	4.9	2.8	5.9	2.7
20.	Lisina	11.7	1.9	8.0	5.4	/	17.4
	Histidina	2.8	0.6	2.3	1.8	9.0	6.7
	Arginina	5.1	1.8	3.1	1.8	6.6	4.9



REIVINDICACIONES

Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente italiana nº 5. 68.136 A/70 del 4 de Abril de 1.970.

10. 1.- Un procedimiento para la preparación de mezclas de L-aminoácidos naturales a partir de materiales proteínicos por hidrólisis ácida de estos últimos en un medio acuoso que contiene un ácido mineral como agente hidrolizante y separación consecutiva de la mezcla de aminoácidos aparte del hidrolizado, caracterizado por diluirse con agua el hidrolizado filtrado que contiene el ácido mineral de hidrólisis y los aminoácidos y ponerse la dilución en contacto de cambio iónico con una resina catiónica del tipo de ácido sulfónico, después de 15. lo cual los aminoácidos fijados por la resina se eluyen con solución acuosa de amoníaco que tenga una concentración no superior a 2,55% en peso de NH_3 y se descarga del eluato el amoníaco por evaporación a presión baja.

20. 2.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por diluirse de 2 a 20 veces el hidrolizado filtrado.

25. 3.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado en que la resina catiónica es un sulfonato de poliestireno con 8% aproximadamente de enlaces de reticulación divinilbencénicos.

ME

12 = 389894



- 4.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1, 2 ó 3, caracterizado en que el medio de hidrólisis consiste en solución acuosa de ácido sulfúrico y la concentración de ácido (expresado como H_2SO_4) se halla entre 10 y 40% en peso.
5. 5.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por hacerse pasar el hidrolizado filtrado y diluido por una columna de la citada resina a la velocidad de 0,6 a 1,0 litros de hidrolizado diluido y filtrado por hora y por litro de resina.
10. 6.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por usarse la resina en la forma ácida.
- 7.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por usarse la resina en la forma amónica.
- 8.- Un procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado en que, después de la elución, se vuelve a usar la resina, sin regenerarla, para separar otras cantidades más de aminoácidos.
15. 9.- Un procedimiento para la preparación de mezclas de L-aminoácidos naturales.
20. Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 12 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a - 3 ABR. 1971

p.a.

J. J. ISERN
P. P.

ME