

P.- 50.908

414/72



603207

**Memoria descriptiva**

Int. Cl.: A23K//A23J

para solicitar PATENTE DE INVENCION por 20 años

a nombre de GEORGE O. KOHLER y EMANUEL M. BICKOFF

~~entidad~~ de nacionalidad norteamericana

con domicilio en 2259 Tamalpais Avenue, El Cerrito y 26  
Binnacle Hill, Oakland, respectivamente,  
ambos en California, Estados Unidos de  
América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA FRACCIONAR MATERIAL VEGETAL  
FOLIACEO VERDE"  
(Clase Internacional A231)

Prioridad reivindicada: Estados Unidos de América 28 de  
Mayo de 1.971 N° 147.947



~~303207~~

403207

P.-50.908  
-----  
414/72

5                    Este invento se refiere, y tiene entre sus ob-  
jetos, a la creación de nuevos procedimientos para frac-  
cionan alfalfa y otras plantas de cosecha verdes foliá-  
ceas para obtener de este modo una proteína comestible de  
calidad alimenticia más otras fracciones útiles para la  
10 alimentación de animales y otros fines. Objetos adiciona-  
les del invento resultarán evidentes de la descripción  
que sigue, en la cual las partes y porcentajes están en  
peso a menos que se especifique otra cosa.

15                    Los dibujos anejos son un organigrama que ilus-  
tra la práctica del invento.

20                    En la descripción que sigue, se hace énfasis en  
el tratamiento de alfalfa, que constituye la principal  
planta de cosecha para forraje en los Estados Unidos. Sin  
embargo, la referencia a este material particular se efec-  
túa sólo a título ilustrativo y no limitativo. En su ámbi-  
to amplio, el invento es aplicable a plantas de cosecha  
verdes foliáceas en general, por ejemplo hierbas, trébol  
japonés (lespedeza), trébol, alfalfa y plantas de forraje  
convencionales similares, y otros materiales vegetales  
25 verdes foliáceos tales como lechuga, col, berza, guisantes



403207

~~393207~~

o enredaderas de haba, cabezas de cebolla, cabezas de remolacha y similares, que son hechos crecer deliberadamente para la alimentación de animales o están disponibles como residuos o subproductos de factorías de envasado o tratamiento de alimentos.

Es bien sabido que la alfalfa es un rico manantial de valiosos materiales nutricios, incluyendo proteínas, carotenos (pro-vitamina A), lípidos, azúcares, sales minerales, factores de crecimiento no identificados (FCNI), etc., y se han desarrollado métodos para separar varios de estos componentes. En general, estos métodos son útiles solamente para proporcionar productos útiles para la alimentación de animales. Se han efectuado intentos de aislar las proteínas de modo que puedan ser utilizadas para fines alimenticios, por ejemplo para enriquecer granos u otros alimentos pobres en contenido proteínico. Estos intentos no han encontrado éxito dado que los productos aislados estaban contaminados con otros componentes de alfalfa, de manera que no podían ser utilizados para fines alimenticios. Típicamente, los productos aislados contenían proporciones sustanciales de clorofila, eran de color verde y de sabor amargo, de manera que no podían ser utilizados en productos alimenticios.

En la solicitud pendiente de Bickoff, Spencer y Kohler, Serial número 883.544, presentada el 9 de diciem-

403207

~~303207~~

26



bre de 1.969, se describe un procedimiento para fraccionar alfalfa que rinde - entre otras fracciones - un concentrado proteínico. Este producto es valioso como una ración de elevada energía para alimentar animales, particularmente aves de corral. Aunque el producto es rico en proteínas, también contiene proporciones sustanciales de otras sustancias tales como clorofila y otros pigmentos. Consiguientemente, no es apropiado para utilización con seres humanos.

Un objeto particular del invento es proporcionar métodos de fraccionamiento que rindan productos proteínicos con un estado de pureza tal que éstos puedan ser empleados como alimento para seres humanos. Otro objeto del invento es el de crear métodos de fraccionamiento que rindan adicionalmente fracciones útiles para la alimentación de animales y para otros fines.

Los objetos del invento se logran aplicando a alfalfa - o a otras plantas de cosecha foliáceas - un método que puede ser dividido básicamente en las siguientes operaciones principales:

I. Formación de zumo verde (L-1). Es inherente a esta operación la producción de material vegetal seco (fracción A) útil para la alimentación de animales.

II. Separación de la fracción B del zumo verde (L-1). La fracción B es un producto que contiene las pro-

403207

~~393207~~

26



teínas cloroplásticas; clorofila; carotenos, xantófila y otros carotenoides; y lípidos. Es útil para la alimentación de animales ya que tiene bajo contenido en fibras y elevado contenido en proteínas, carotenos y xantófilas.

5 El residuo de esta operación es denominado zumo transparente o purificado (L-2).

10 III. Separación de la fracción C del zumo transparente o purificado (L-2). La fracción C constituye el producto principal del invento y contiene las proteínas citoplásmicas derivadas de la alfalfa original. Está esencialmente exento de clorofila, carotenoides, lípidos, y principios amargos y otros componentes de sabor indeseables. Se puede hacer observar que las proteínas citoplásmicas son las más deseables para utilización con seres humanos.

15

El residuo de esta operación es denominado zumo pardo (L-3); puede ser concentrado para proporcionar un jarabe (fracción D) útil en la alimentación de animales.

20 La práctica del invento se describe seguidamente con detalle, haciendo referencia a los dibujos, y aplicado a la alfalfa, a título de ejemplo.

Operación I: Formación de zumo verde

25 El material de partida para el fraccionamiento es alfalfa verde recientemente cosechada, preferiblemente en forma triturada. En la práctica granjera usual, la al-



403207

~~303207~~

alfalfa es triturada según es cosechada. Este material vegetal verde triturado convencional es el material de partida seleccionado para el presente procedimiento.

5 El material verde recientemente cosechado es alimentado al mezclador 1 que puede adoptar la forma, por ejemplo, de un recipiente provisto con un tornillo sin fin mezclador, o un tambor rotatorio. El mezclador 1 es utilizado ventajosamente para incorporar aditivos deseados en la masa de alfalfa, siendo los aditivos preferidos agua o zumo pardo (L-3) más un agente alcalinizador y/o un agente reductor tal como metabisulfito sódico, ácido ascórbico, o etoxiquina. La influencia de estos aditivos se describe en una porción posterior de la memoria descriptiva.

15 Después de la etapa de mezclado, el material de alfalfa verde es sometido a extracción de zumo haciéndolo pasar -con o sin previa molienda- a través de la prensa 2 que puede adoptar la forma, por ejemplo, de una serie de rodillos para caña de azúcar convencionales. Otros dispositivos que se pueden utilizar para la extracción de zumo son prensas de tornillo sin fin o aparatos expulsores. Dado que la meta es la de asegurar la mayor cantidad posible de zumo a partir de la alfalfa, se puede hacer pasar el material vegetal repetidamente a través de un único par de rodillos de compresión o, alternativamente, hacer pasar el material a través de un puesto con varios pares



403207

~~393207~~

de rodillos de compresión. El material vegetal recibido de una operación de compresión puede ser mezclado ventajosamente con un nuevo lote de aditivos antes de ser pasado a la siguiente serie de rodillos de compresión.

5                   En esta operación de extracción de zumo, se produce una fracción de zumo verde (L-1) y una torta comprimida de material fibroso. Generalmente, esta torta comprimida tendrá un contenido de humedad de aproximadamente 65 - 75%. Las cantidades respectivas de zumo y torta comprimida variarán dependiendo principalmente del contenido

10 de humedad del material de partida. En operaciones típicas, 100 kg de alfalfa verde producirán (a) aproximadamente 50 a 60 kg de torta comprimida y (b) una cantidad total de zumo de aproximadamente 40 a 50 kg más la cantidad de líquido (zumo pardo o agua) añadido en la etapa de mezclado

15 por cada 45 kg de alfalfa.

La torta comprimida es transportada a través del secador 3, que puede adoptar la forma de un horno rotatorio utilizado convencionalmente para operaciones de secado

20 de alfalfa, rindiendo un producto seco designado aquí como fracción A, y que es útil para la alimentación de animales.

En experimentos que emplean una alfalfa de alta calidad obtenida en California del Norte, la fracción A contiene (sobre base en seco) lo siguiente:

25

18.5.72

403207

~~303207~~

20



	Proteínas <sup>##</sup>	23% <del>###</del>
	Grasas	4%
	Fibras	23%
	Cenizas	10%
5	ELN <sup>##</sup>	40%
	Carotenos	333 mg/kg
	Xantófila	777 mg/kg

<sup>##</sup> Contenido de nitrógeno x 6,25

10 ~~##~~ Extracto libre de nitrógeno (en su mayor parte carbohidratos), por diferencia.

~~##~~ Aplicado a alfalfa típica tal como se obtiene en un trabajo comercial, el contenido de proteínas será inferior en varios tantos por cien.

15 En lo que antecede, se ha hecho observar que en el mezclador 1 se pueden incorporar ciertos aditivos en la alfalfa antes de la operación de compresión. Se ha encontrado que si se añade un agente alcalinizador, una mayor proporción de proteínas será transferida del material vegetal al zumo verde. Esto es una situación deseable, ya  
20 que significa que se formará una mayor cantidad de proteínas en las subsiguientes operaciones cuando sean aisladas las fracciones B y C. En calidad de agente alcalinizador, se puede utilizar amoníaco, hidróxido de amonio, o hidróxidos o carbonatos de sodio o potasio. Usualmente, se añ  
25 de suficiente cantidad del agente alcalinizador para esta

403207

~~393207~~



blecer un pH de aproximadamente 7 a 11.

Para aplicar el agente alcalinizador, éste es disuelto preferiblemente en agua y la solución acuosa resultante es mezclada con la alfalfa. La adición de agua es útil además para aumentar la transferencia de proteínas desde el tejido vegetal al zumo verde. Además, en lugar de utilizar agua, se puede utilizar el zumo pardo (L-3) que queda como residuo de la operación III. Por ejemplo, en trabajo continuo de acuerdo con el invento, una porción de L-3 puede ser recirculada de modo continuo al mezclador 1. En el caso en que se utilice agua (o zumo pardo) como aditivo, éste se emplea preferiblemente en la proporción de 1 a 3 kg del mismo por cada kg de alfalfa. Sin embargo, se pueden utilizar cantidades mucho mayores, por ejemplo de 10 kg del mismo, por cada kg de alfalfa.

Diversas sustancias pueden ser incorporadas opcionalmente en la alfalfa en la operación de extracción de zumo. Por ejemplo, se puede añadir un antioxidante convencional para hacer mínimo el deterioro de carotenoides. Para este fin se puede emplear cualquiera de los agentes antioxidantes que se sabe que son útiles para proteger carotenoides en alfalfa o en otros materiales alimenticios. Compuestos típicos de esta clase son los descritos en las patentes números 2.562.970, 2.611.703, 2.651.572, 2.686.124 y 2.711.962, siendo un ejemplo preferido la 6-etoxi-2,2,4-

403207

~~303207~~

26



-trimetil-1,2-dihidroquinoleína, conocida comúnmente como etoxiquina. Sólo se requiere una cantidad secundaria del agente antioxidante aproximadamente 0,01 a 0,5%, basado en el peso en seco de alfalfa.

5                   Otros aditivos opcionales son metabisulfito de sodio y ácido ascórbico.

10                   Se prefiere la adición de metabisulfito de sodio, o en general cualquier manantial de ión sulfito. Ejemplos de tales manantiales incluyen, sin quedarse limitado a ellos, bisulfito de amonio, sulfito de sodio, dióxido de azufre gaseoso y ácido sulfuroso. Se ha de hacer observar, sin embargo, que el margen de porcentaje ponderal de dicho aditivo de ión bisulfito es menor de 1% de equivalente de bisulfito sódico. Dicho aditivo es introducido preferible-  
15                   mente antes de la adición del agente alcalinizador y antes de la primera operación de compresión (2). No obstante, dicha adición se puede efectuar en cualquier momento antes de que tengan lugar las operaciones de calentamiento en los dispositivos calentadores (4) y (14).

20                   Otro modo de acrecentar la transferencia de proteínas desde el tejido vegetal al zumo verde consiste en reducir el tamaño de los trozos de alfalfa. Esto se efectúa convenientemente proporcionando en el mezclador 1, paletas rotatorias, o elementos similares, para provocar un  
25                   desmenuzamiento de las partículas vegetales cuando éstas

403207

~~303207~~

26 MAR 1972



5 entran en contacto con el agua (o zumo pardo) que contenga el agente alcalinizador. Alternativamente, la alfalfa puede ser triturada antes de ser introducida en el mezclador 1. Para obtener los mejores resultados (máxima transferencia de proteínas al zumo), el desmenuzamiento se aplica cuando la alfalfa está siendo mezclada con los aditivos en el mezclador 1.

10 Entra dentro del ámbito amplio del presente invento llevar a cabo la operación I (formación del zumo verde) de la misma manera que se describe en la antedicha solicitud. Serial número 883.544, cuya memoria descriptiva se incorpora aquí a título de referencia.

EJEMPLO 1.-

15 Este ejemplo ilustra el modo en que un aumento en el pH acrecienta la transferencia de proteínas desde el tejido de alfalfa al zumo verde.

20 Porciones de veinticinco gramos de alfalfa triturada recientemente cosechada fueron mezcladas con porciones de 250 ml de agua y el pH se ajustó (por adición de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio) a un nivel particular que se indica seguidamente. Las mezclas fueron amasadas durante 2 minutos y luego separadas en sus componentes de material vegetal fibroso y zumo verde, siendo analizado este último en cuanto al contenido de nitrógeno.

25 Las condiciones utilizadas y los resultados obte-

18.5.72

403207

~~305207~~



nidos están tabulados seguidamente:

pH	Contenido del nitrógeno del zumo verde % de N total en alfalfa
4,0	18,6
4,7	25,4
5,3	48,7
5,8 <sup>±</sup>	65,1
9,6	70,4
10,7	74,9
11,4	81,0

± pH natural del zumo.

15

EJEMPLO 2.-

Este ejemplo ilustra el modo en que la desintegración de la alfalfa acrecienta la transferencia de proteínas desde el tejido de alfalfa al zumo verde.

20

Porciones de veinticinco gramos de alfalfa triturada recientemente cosechada fueron mezcladas con porciones de 250 ml de agua, y el pH fué ajustado a 8 con hidróxido de sodio. Luego las mezclas fueron sometidas a acción desintegrante, aplicada exponiéndolas durante diversos periodos de tiempo a una paleta rotatoria que ejercía una acción de corte sobre los tallos de alfalfa. Las mezclas fueron luego separadas en sus componentes de material vegetal

25

18.5.72

403207

~~393207~~

26



fibroso y zumo verde, siendo este último analizado en cuanto al contenido de nitrógeno.

Las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos están tabulados seguidamente:

	Duración de la acción de desintegración, minutos	Contenido de nitrógeno del zumo verde; % de N total en alfalfa
5	1	45
	2	68
10	4	86

Operación II - Separación de material cloroplástico (Fracción B)

El zumo verde (L-1) formado en la prensa 2 es empleado como material de partida en esta operación. Es deseable que no haya ningún retardo sustancial entre la formación del zumo verde en la operación de compresión y la iniciación de la operación II, dado que se desarrolla con rapidez la hidrólisis de proteínas una vez han sido rotas las células. Esta hidrólisis, que es provocada por enzimas proteolíticas, puede ser hecha mínima por ajuste apropiado del pH del zumo al margen alcalino por encima de 8,0.

En esta operación (II) el zumo verde es tratado para eliminar selectivamente proteínas cloroplásticas,

403207

~~303207~~

26 MAYO 1972



clorofila, carotenoides, y lípidos, al mismo tiempo que se dejan en solución las proteínas citoplásmicas.

5 En una realización preferida del invento, el pH del zumo verde es ajustado inicialmente, cuando es necesario, para llevarlo a un nivel de aproximadamente 5-6. Si el zumo es desde neutro a alcalino como resultado de haberse añadido amoníaco u otra base en la etapa de compresión, este ajuste de pH requeriría la adición de ácido clorhídrico, sulfúrico, fosfórico u otro ácido no tóxico.

10 El zumo verde - con o sin ajuste del pH - es hecho pasar luego a través del calentador 4 que puede adoptar la forma de un cambiador de calor convencional, y en que el zumo es llevado a una temperatura de aproximadamente 50°C, y es mantenido preferiblemente a dicha temperatura durante aproximadamente 1 a 5 minutos. Alternativa-  
15 mente, la velocidad de calentamiento puede ser ajustada de tal modo que se obtenga el efecto equivalente de dicha permanencia cuando el zumo sea llevado a 50°C.

20 En esta etapa de calentamiento, un punto crítico es el hecho de que el calor debe ser aplicado de manera tal que ninguna porción importante del zumo alcance una temperatura sustancialmente superior al margen especificado. Este punto es tal que si porciones del zumo resultasen calentadas excesivamente, el método tendería a  
25 perder su aspecto preferente debido a que alguna canti-

403207

~~393207~~

26 MAYO 1972



dad del contenido de proteínas citoplásmicas del zumo se-  
rá precipitado con las proteínas cloroplásticas, clorofi-  
la y carotenoides. Dicho indeseable efecto de calentamien-  
to excesivo puede ser evitado de diversas maneras. Por  
5 ejemplo, la temperatura del zumo puede ser aumentada por  
exposición a un baño de agua moderadamente caliente o a  
otro manantial de calor que proporcione un gradiente de  
temperatura relativamente bajo. Recursos tales como agi-  
tación pueden ser aplicados ventajosamente al zumo duran-  
10 te el calentamiento con el fin de mantener una temperatu-  
ra uniforme por toda la masa de líquido. Otro modo impli-  
ca hacer circular el zumo a través de un serpentín que es-  
tá sumergido en un depósito que contiene agua u otro me-  
dio de intercambio de calor mantenido a una temperatura  
15 de 50°C o algo por encima de ésta, de manera que el zumo  
al pasar a través del serpentín sea llevado de modo uni-  
forme al margen de temperaturas deseado.

Después de que el zumo ha sido calentado tal co-  
mo se describe anteriormente, es hecho pasar a través del  
20 refrigerador 5 que puede adoptar la forma de un intercam-  
biador de calor convencional, en donde el zumo es enfria-  
do a la temperatura ambiente. Por aplicación de las opera-  
ciones arriba descritas, el contenido cloroplástico del  
zumو es aglomerado en forma de una suspensión verde de  
25 textura fina.

403207

~~307207~~

26



5 Para separar este material cloroplástico, la mezcla es centrifugada (bloque 6), para producir de este modo (1) el zumo purificado residual (L-2) y (2) el material cloroplástico que contiene parcialmente proteínas cloroplásticas, clorofila, carotenos, xantófila y otros carotenoides, lípidos, factores de crecimiento no identificados, etc.

10 La mezcla es luego filtrada a través de tierra de diatomeas en un filtro prensa. Esto produce un líquido transparente brillante o abrigantado, pero también, en las realizaciones preferidas ilustradas por los experimentos 4 a 8, ambos inclusive, de la tabla de la página 19, un color pardo claro. Los fragmentos cloroplásticos quedan como residuo en el filtro de diatomeas.

15 Después de que el material cloroplástico es separado por la centrífuga 6, pero antes de pasar al secador 7, de modo preferible el producto centrifugado es calentado mediante inyección de vapor de agua a 80°C durante aproximadamente 1 minuto. Esto cambia al producto centrifugado desde un gel hidrófilo a una consistencia del tipo de queso de bola que rezuma agua, que luego puede ser comprimida (en una prensa de Willmes) a una consistencia menos húmeda, es decir la humedad es reducida desde un contenido de sólidos de 12% a otro contenido de sólidos de 20 46%. Luego el material del tipo de torta es susceptible de 25

403207

~~393207~~



ser granulado y es hecho pasar a través de un granulador. A continuación el producto es dirigido al secador 7 que puede adoptar la forma de un tambor doble convencional o de un deshidratador rotatorio. El producto secado, fracción B, es un material valioso para la alimentación de animales. En experimentos típicos la fracción B contiene (sobre base en seco) lo siguiente:

	Proteínas <sup>¶</sup>	54,5 %
	Grasas	9,3 %
10	Fibras	1.56%
	Cenizas	18,1 %
	ELN <sup>¶¶</sup>	21,0 %
	Carotenos	111 mg/kg
	Xantófila	2666 mg/kg

15 <sup>¶</sup> Contenido de nitrógeno x 6,25

<sup>¶¶</sup> Extracto libre de nitrógeno (en su mayor parte carbohidratos), por diferencia.

### EJEMPLO 3

20 Este ejemplo ilustra métodos para separar el material cloroplástico (fracción B).

Muestras de zumo verde preparadas a partir de alfalfa tal como se describe anteriormente fueron ajustadas (con ácido clorhídrico) a un pH de 5,8 ó 5,3. Luego las muestras fueron calentadas a 50°C, utilizando diferentes velocidades de calentamiento y diferentes tiempos de per-

25

403207

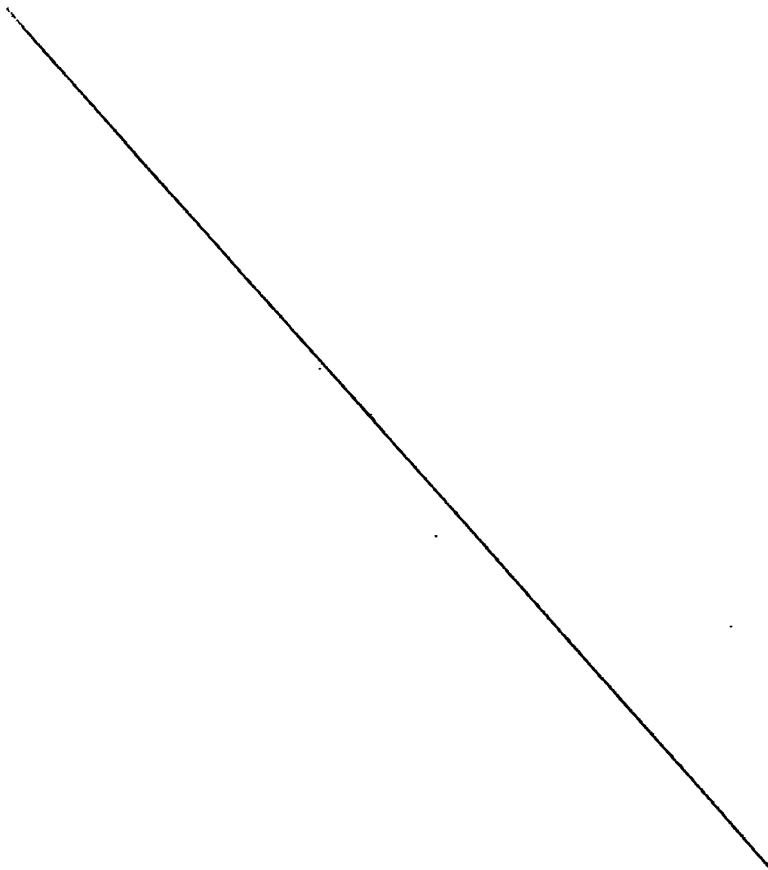
~~393207~~



manencia a 50°C. Después de la etapa de calentamiento, las muestras fueron enfriadas a la temperatura ambiente y centrifugadas durante 3 minutos, aplicando una fuerza de máximo de 10,000 veces la de la gravedad durante unos pocos segundos durante dicho periodo. El material cloroplástico separado y el zumo residual fueron analizados.

Las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos están tabulados seguidamente.

10





~~383207~~  
403207

~~383207~~  
403207

Ensayo	pH	Condiciones de calentamiento		Material cloro-plástico. Contenido de proteínas en tanto por cien de proteínas en el zumo verde	Zumo residual	Aspecto
		Tiempo hasta llegar a 50°C minutos	Tiempo de mantenimiento a 50°C minutos		Contenido de proteínas, en tanto por cien de proteínas en el zumo verde	
1	5,8	1/2	0	51	49	Turbio, verde
2	5,8	1	1	62	38	Turbio, verde
3	5,8	3	0	59	41	Turbio, verde
4	5,8	3	1	62	38	Transparente, pardo
5	5,8	3	2	64	36	Transparente, pardo
6	5,3	3	0	66	34	Transparente, pardo
7	5,3	3	1	69	31	Transparente, pardo
8	5,3	3	2	68	32	Transparente, pardo

~~307207~~  
403207

Ensayo	pH	Condiciones de calentamiento		Material cloro plastico. Cont nido de proteí en tanto por c de proteínas e el zumo verde
		Tiempo hasta llegar a 50°C minutos	Tiempo de man tenimiento a 50°C minutos	
1	5,8	1/2	0	51
2	5,8	1	1	62
3	5,8	3	0	59
4	5,8	3	1	62
5	5,8	3	2	64
6	5,3	3	0	66
7	5,3	3	1	69
8	5,3	3	2	68

26 11/10/72



~~30/11/72~~  
**403207**

to nan a	Material cloro- plastico. Conte- nido de proteínas en tanto por cien de proteínas en el zumo verde	Zumo residual	
		Contenido de proteínas, en tanto por cien de pro- teínas en el zumo verde	Aspecto
	51	49	Turbio, verde
	62	38	Turbio, verde
	59	41	Turbio, verde
	62	38	Transparente, pardo
	64	36	Transparente, pardo
	66	34	Transparente, pardo
	69	31	Transparente, pardo
	68	32	Transparente, pardo

403207

~~303207~~



5 Se consideró que los experimentos 4, 5, 6, 7 y 8 proporcionaban los mejores resultados de la serie, dado que en estos experimentos el zumo residual era transparente y estaba libre de coloración verde, indicando una separación completa de material cloroplástico.

10 En un método alternativo para separar el material cloroplástico (fracción B), se emplea un calentamiento muy rápido a una temperatura por encima de 55°C, seguido de modo inmediato o después de un periodo de permanencia muy corto, por enfriamiento a una temperatura por debajo de 40°C. Luego se aplica la centrifugación para separar el material cloroplástico.

15 El rápido calentamiento deseado se logra con facilidad mediante la utilización de un calentador por inyección de vapor de agua o elemento similar.

#### EJEMPLO 3A

Este ejemplo ilustra la aplicación de un calentamiento rápido en la operación II.

20 Un calentador por inyección de vapor de agua capaz de calentar el zumo verde a 70°C en 0,6 segundos o menos, fue utilizado en estos experimentos. De este modo, muestras de zumo verde fueron calentadas a diversas temperaturas, a saber 55, 60, 65 y 70°C. En algunos casos el zumo caliente fue inmediatamente enfriado (hasta por debajo  
25 de 40°C); en otros casos, el zumo fue mantenido mientras

403207

~~303207~~

26 MAYO



5

estaba en estado caliente durante un periodo de tiempo de-  
finido antes de enfriar. En cada uno de los casos, el pro-  
ducto enfriado fue centrifugado para eliminar el material  
cloroplástico y el zumo transparente resultante fue anali-  
zado para determinar la cantidad de proteínas citoplásmi-  
cas que quedaba en él.

Las condiciones utilizadas y los resultados obte-  
nidos están tabulados seguidamente.

18.5.72.

-21-



20

~~398207~~

403207

Aspecto del zumo transparente

Tanto por cien de proteínas cito plásmicas originales remanentes en el zumo transparente.

~~398207~~

403207

Condiciones de tratamiento

Temperatura °C.	Tiempo de calentamiento, segundos	Tiempo de permanencia (en caliente), segundos	Tiempo de enfriamiento, segundos
55	0,6	0	6,8
60	0,6	0	10,4
60	0,6	10	9,1
60	0,6	20	10,6
65	0,6	0	11,4
70	0,6	0	10,2

55	96	Turbio, verde
60	88	Turbio, verde
60	95	Transparente, pardo
60	83	Transparente, pardo
65	80	Transparente, pardo
70	71	Transparente, pardo

~~XXXXXXXXXX~~  
403207

<u>Condiciones de tratamiento</u>				Tanto por cien de plásmicas origin: en el zumo trans:
Temperatura °C.	Tiempo de calenta- miento, segundos	Tiempo de permanen- cia (en ca liente), segundos	Tiempo de enfriamien to, segun- dos.	
55	0,6	0	6,8	96
60	0,6	0	10,4	88
60	0,6	10	9,1	85
60	0,6	20	10,6	83
65	0,6	0	11,4	80
70	0,6	0	10,2	71

26 10 1972

~~393207~~

403207

Tanto por cien de protefinas cito  
plásmicas originales remanentes  
en el zumo transparente.

Aspecto del zumo  
transparente

96	Turbio, verde
88	Turbio, verde
85	Transparente, pardo
83	Transparente, pardo
80	Transparente, pardo
71	Transparente, pardo

26 MAY 1972

~~393207~~  
403207

OPERACION III - SEPARACION DE PROTEINAS CITO-  
PLASMICAS

(Fracción C)

5 El zumo purificado (L-2) que queda de la operac  
ción II es empleado como el material de partida en esta  
operación.

El objeto de esta operación es el de separar  
las proteínas citoplásmicas del zumo transparente, y este  
objeto se puede lograr de diversos modos. Las proteínas  
10 citoplásmicas pueden ser precipitadas por cualquiera de  
los siguientes métodos alternativos:

1) Adición de ácido para proporcionar un pH de  
aproximadamente 3 a 4,8.

15 2) Calentamiento a una temperatura por encima  
de 50°C, por ejemplo 55-80°C.

3) Adición de ácido para proporcionar un pH de  
aproximadamente 3 a 4,8, más calentamiento a una tempera  
tura por encima de 50°C, por ejemplo 55-80°C.

20 Además, se puede aplicar uno cualquiera o va  
rios de los antedichos tratamientos en sucesión para ase  
gurar la recuperación de la totalidad de las proteínas de  
seadas. Dicha técnica puede adoptar, por ejemplo, las si  
guientes formas.

25 El zumo L-2 es calentado a 55°C, es enfriado,  
y luego se retira la proteína precipitada. El líquido re

18.5.72.

26 MAYO 1972



~~383207~~  
403207

sidual es sometido luego al mismo tratamiento una o varias veces, aplicando en cada caso temperaturas sucesivamente crecientes, y obteniéndose una serie de productos aislados proteínicos.

5 Alternativamente, se puede emplear el modo anterior pero utilizando un pH sucesivamente menor (con o sin aumento de temperatura) de nuevo para recibir una serie de productos aislados proteínicos.

10 Dichos tratamientos sucesivos tienen la ventaja de producir productos aislados especialmente puros y no desnaturalizados en las primeras etapas, en donde son moderadas las condiciones de acidificación y temperatura.

15 Un tratamiento particularmente preferido implica sucesiva acidificación, sin ninguna aplicación de calentamiento, siendo conducido el procedimiento a la temperatura ambiente. El zumo L-2 es primero acidificado a un pH de 4,8 y se aplica centrifugación, con lo cual se aísla la proporción principal (usualmente dos tercios) de la proteína citoplásmica total en forma particularmente pura y no desnaturalizada. El líquido residual es luego acidificado a un pH de 3 y centrifugado, con lo cual se aísla la porción restante de las proteínas citoplásmicas en una forma útil como alimento para seres humanos, aunque no tan pura como la primera fracción.

25 Refiriéndose a los dibujos, se describen dos

18.5.72.

403207

~~305207~~



técnicas alternativas para precipitar las proteínas cito  
plásmicas, implicando una de ellas la adición de un áci-  
do, y estando basada la otra en un tratamiento térmico.

5 En el método que implica la adición de un áci-  
do, el zumo purificado (L-2) procedente de la centrífuga  
6 es dirigido por la conducción 8 al mezclador 9 en donde  
es mezclado con suficiente cantidad de ácido para llevar  
el pH a un nivel de 3 a 4,8. Para este fin se puede utili-  
zar ácido sulfúrico, clorhídrico, fosfórico o cualquier  
10 otro ácido no tóxico.

Para separar la proteína citoplásmica precipi-  
tada, la mezcla acidificada es luego centrifugada (bloque  
10) para producir de este modo (a) una cuajada que con-  
tiene las proteínas citoplásmicas libres de clorofila,  
15 carotenoides, lípidos y principios amargos u otros compo-  
nentes de sabor indeseables.

Las proteínas citoplásmicas separadas mediante  
la centrífuga 10 son luego lavadas en el bloque 11 con  
agua (acidificada a un pH de aproximadamente 4-5) para  
20 eliminar impurezas solubles en agua. Después de lavar,  
el pH del material proteínico es ajustado preferiblemen-  
te a casi neutralidad enjuagándolo con una solución dilui-  
da de hidróxido de sodio, y luego es dirigido al seca-  
dor 12--por ejemplo un aparato convencional de secado por  
25 congelación. El producto secado, fracción C, es valioso

26 MAYO 1972



403207 ~~323207~~

para la utilización en seres humanos, por ejemplo, para suplementar cereales u otros alimentos que son deficitarios en contenido de proteínas. En experimentos típicos, la fracción C contiene (sobre base en seco) lo siguiente:

5	Proteínas $\times$	85%
	Grasas	0,66%
	Fibras	0,20%
	Cenizas	4,32%
	ELN $\times\times$	9,8 %
10	Carotenos	Nada
	Xantófila	Nada

$\times$  Contenido de nitrógeno  $\times$  6,25.

$\times\times$  Extracto libre de nitrógeno (en su mayor parte carbohidratos), por diferencia.

15                    En el caso en que se utilice el método alternativo de precipitación por calentamiento, el zumo transparente (L-2) es dirigido por la conducción 13 al calentador 14 que puede adoptar la forma de un intercambiador de calor convencional o uno que utilice inyección directa de vapor de agua, y en que el zumo es llevado a aproximadamente 55 a 80°C y mantenido preferentemente a dicha temperatura durante un periodo de aproximadamente 1 a 5 minutos.

20                    El zumo caliente es hecho pasar luego a través del refrigerador 15 en donde es enfriado a la temperatura ambiente. Por aplicación de las etapas arriba descri-

25

18.5.72.

403207

~~303207~~

26



tas, las proteínas citoplásmicas son precipitadas en forma de una cuajada de color pardo claro. Para separar la cuajada, la mezcla es centrifugada en el bloque 10, y es tratada ulteriormente por lavado, secado, etc., todo tal como se acaba de describir anteriormente.

EJEMPLO 4.

Este ejemplo ilustra técnicas de acidificación para separar las proteínas citoplásmicas (fracción C).

Muestras de zumo purificado (L-2) fueron acidificadas a diferentes valores de pH con ácido clorhídrico, y fueron centrifugadas para retirar la proteína citoplásmica precipitada. Se condujeron análisis, tanto con el zumo residual como con los precipitados. Las condiciones utilizadas y los resultados obtenidos están tabulados seguidamente.

18.5.72.

403207

~~403207~~

26



Experi mento	pH	Proteínas citoplásmicas Contenido en proteínas, en % de proteínas en zu mo purificado.	Zumo residual. Contenido de pro teínas, en % de proteínas en zumo purificado.	
5				
	1	3,0	100	0
	2	3,2	98	2
	3	3,4	94	6
	4	3,6	96	4
10	5	3,8	90	10
	6	4,0	83	17
	7	4,2	81	19
	8	4,4	74	26
	9	4,6	71	29
15	10	4,8	68	32

EJEMPLO 5.

20 Este ejemplo ilustra métodos de calentamiento para separar las proteínas citoplásmicas (fracción C).

Muestras de zumo purificado (L-2) que tenían un pH de 5,8 -6 fueron calentadas a diferentes temperaturas, enfriadas y centrifugadas para retirar las proteínas cito plásmicas precipitadas. Se realizaron análisis tanto con 25 el zumo residual como con los precipitados. Las condicio

18.5.72.

403207

~~30/12/72~~



nes utilizadas y los resultados obtenidos están tabulados seguidamente.

Expe- ri- mento	Condiciones de ca- lentamiento		Proteínas cito- plásmicas. Contenido de proteínas, en % de proteínas en zumo purifi- cado	Zumo residual. Contenido de proteínas, en % de proteínas en zumo purifi- cado.		
	Tempera- tura °C	Tiempo, minutos				
5	1	55	1	23	77	
	10	2	55	5	27	73
		3	60	1	26	74
	4	60	5	48	52	
	5	65	1	48	52	
	6	65	5	83	17	
15	7	70	1	86	14	
	8	70	5	88	12	
	9	75	1	90	10	
	10	75	5	89	11	
	11	80	1	90	10	
20	12	80	5	92	8	

Dirigiendo atención a los dibujos, el zumo residual (L-3) procedente de la centrífuga 10 es dividido en dos porciones. Una de las porciones es recirculada por la conducción 16 al mezclador 1 para ser incorpora-

26 MAY 1972



~~403207~~

403207

do en nuevas tandas de alfalfa. La otra porción es dirigida por la conducción 17 a un evaporador súbito convencional 18 en donde es concentrada para producir un jarabe que contiene aproximadamente 50-70% de sólidos. Este jarabe, denominado aquí fracción D, es un manantial rico de materiales nutricios solubles en agua, derivados de la alfalfa original. Es particularmente valioso debido a su contenido de FCNI (factores de crecimiento no identificados, que afectan beneficiosamente al crecimiento, a la salud y a la reproducción de aves de corral, ganado porcino y rumiantes). También contiene aminoácidos, azúcares, sales minerales, y vitaminas solubles en agua.

En experimentos típicos, la fracción D contiene, (sobre base en seco) lo siguiente:

15	Componentes nitrogenados	29%
	Grasas	Nada
	Fibras	Nada
	Cenizas	20%
	ELN ***	51%
20	Carotenos	Nada
	Xantófila	Nada

\*\*\* Extracto libre de nitrógeno (en su mayor parte carbohidratos), por diferencia.

403207

~~303207~~



R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Un procedimiento para fraccionar material vegetal foliáceo verde que comprende: a) comprimir el ma terial para formar un zumo y una torta comprimida; b) ca 5 lentar el zumo y luego enfriarlo para formar de este modo un aglomerado que contiene proteínas cloroplásticas, clo rofila, carotenoides y lípidos al tiempo que se retienen en solución las proteínas citoplásmicas; c) retirar dicho aglomerado desde el zumo residual; y d) separar del zumo 10 residual una fracción proteínica esencialmente libre de clorofila, carotenoides y lípidos.

2.- Un procedimiento para fraccionar material vegetal foliáceo verde que comprende: a) comprimir el ma terial para producir un zumo y una torta comprimida; b) 15 calentar el zumo a aproximadamente 50°C, luego enfriarlo para formar de este modo un aglomerado que contiene proteínas cloroplásticas, clorofila, carotenoides, y lípidos al tiempo que retiene en solución proteínas citoplásmicas; c) retirar dicho aglomerado del zumo residual, y d) sepa 20 rar del zumo residual una fracción proteínica esencialmente libre de clorofila, carotenoides y lípidos.

3.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que antes de la compresión el material vegetal es mezcla do con agua.

25 4.- El procedimiento de la reivindicación 2,



403207

~~403207~~

26 MAY 1972

en que antes de la compresión el material vegetal es mezclado con zumo residual que queda de la etapa d).

5 5.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que antes de la compresión el material vegetal es mezclado con un agente alcalinizador en una cantidad que proporciona un pH de aproximadamente 7 a 11.

6.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que antes de la compresión el material vegetal es mezclado con una proporción secundaria de un agente reductor.

10 7.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que el material vegetal, antes de la compresión, es desintegrado mientras está en contacto con un medio acuoso alcalino.

15 8.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que el material vegetal es alfalfa.

9.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa b) el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 5 a 6 antes de calentamiento.

20 10.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa b) el zumo es calentado a aproximadamente 50°C durante un periodo de aproximadamente 1 a 5 minutos.

25 11.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa b) el zumo es calentado bajo condiciones tales que ninguna porción significativa del mismo alcalino.

18.5.72.

26 MAYO 1972

403207

~~393207~~



canza una temperatura sustancialmente mayor que la temperatura que se especifica.

5 12.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa b) el zumo es calentado bajo condiciones tales que la temperatura es aumentada de modo uniforme por toda la masa de zumo para evitar un calentamiento excesivo de cualquier porción significativa de la misma.

10 13.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa d) el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 3 a 4,8 para precipitar la fracción proteínica.

15 14.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa d) el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 4,8 para precipitar una primera porción de la fracción proteínica, siendo separada esta porción, y el líquido residual es luego acidificado a un pH de aproximadamente 3 para precipitar una porción más de la fracción proteínica.

20 15.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa d) el zumo es calentado por encima de 50°C para precipitar la fracción proteínica.

25 16.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa d) el zumo es calentado a una temperatura de aproximadamente 55-80° C para precipitar la fracción proteínica.

18.5.72.



403207

~~403207~~

-2 00



5

17.- El procedimiento de la reivindicación 2, en que en la etapa d) el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 3 a 4,8 y es calentado a una temperatura de aproximadamente 55 a 80°C para precipitar la fracción proteínica.

10

18.- Un procedimiento para fraccionar material vegetal foliáceo verde, en que la fase de tratamiento del zumo derivado del mismo comprende: a) ajustar el pH del zumo, cuando es necesario, a un pH de aproximadamente 5-6, calentarlo a aproximadamente 50°C, luego enfriarlo para formar de este modo un aglomerado que contiene proteínas cloroplásticas, clorofila, carotenoides, y lípidos, al tiempo que se retienen en solución proteínas citoplásmicas; b) retirar dicho aglomerado del zumo residual; y c) separar del zumo residual una fracción proteínica citoplásmica esencialmente libre de clorofila, carotenoides y lípidos.

15

20

19.- El procedimiento de la reivindicación 18, en que en la etapa c) el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 3 a 4,8 para precipitar la fracción proteínica.

25

20.- El procedimiento de la reivindicación 18, en que en la etapa c) el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 4,8 para precipitar una primera porción de la fracción proteínica, esta porción es se-

403207

~~403207~~



parada, y luego el líquido residual es acidificado a un pH de aproximadamente 3 para precipitar otra porción más de la fracción proteínica.

5 21.- El procedimiento de la reivindicación 18, en que en la etapa c) el zumo es calentado a aproximadamente 55-80°C para precipitar la fracción proteínica.

22.- El procedimiento de la reivindicación 18, en que el material vegetal es alfalfa.

10 23.- Un procedimiento para fraccionar material vegetal foliáceo verde, en que la fase de tratamiento del zumo derivado del mismo comprende: a) separar del zumo una primera fracción que contiene proteínas cloroplásticas, clorofila, carotenoides, y lípidos al mismo tiempo que se retienen proteínas citoplásmicas en el zumo; b) separar del zumo residual una  
15 segunda fracción que contiene proteínas citoplásmicas en un estado esencialmente libre de clorofila, carotenoides y lípidos.

20 24.- El procedimiento de la reivindicación 23, en que en la etapa b) el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 3 a 4,8 para precipitar la fracción proteínica.

25 25.- El procedimiento de la reivindicación 23, en que en la etapa b) el zumo es acidificado a un

30-9-74

- 35 -



403207

~~707770~~

-2 OCT 1974



5 pH de aproximadamente 4,8 para precipitar una primera porción de la fracción proteínica, siendo separada esta porción, y luego el líquido residual es acidificado a un pH de aproximadamente 3 para precipitar una porción más de la fracción proteínica.

26.- El procedimiento de la reivindicación 23, en que en la etapa b) el zumo es calentado por encima de 50°C para precipitar la fracción proteínica.

10 27.- El procedimiento de la reivindicación 23, en que en la etapa b), el zumo es acidificado a un pH de aproximadamente 3 a 4,8 y es calentado a una temperatura de aproximadamente 55 a 80°C para precipitar la fracción proteínica.

15 28.- El procedimiento de la reivindicación 1, que incluye la etapa que comprende: añadir ión sulfito procedente de un manantial del mismo en cualquier etapa del procedimiento antes de dichas etapas de calentamiento, estando dicho ión sulfito en una cantidad no mayor de aproximadamente 1% en peso se equivalente de 20 bisulfito de sodio basado en el equivalente de peso en seco del material vegetal foliáceo verde, previamente comprimido.

25 29.- El procedimiento de la reivindicación 28, en que además dicho manantial de ión sulfito es un compuesto seleccionado del grupo que consiste en bisul-

30-9-74

- 36 -



403207

~~303207~~

-2 OCT 1974



fito de amonio, sulfito de sodio, dióxido de azufre gaseoso, y ácido sulfuroso.

5  
30.- El procedimiento de la reivindicación 1, que incluye la etapa que comprende: calentar dicho aglomerado que contiene proteínas cloroplásticas a una temperatura de aproximadamente 80°C durante aproximadamente 1 minuto para convertor de este modo al aglomerado desde un gel hidrófilo a una consistencia a modo de queso de bola que rezuma agua, en que el contenido de  
10 humedad del aglomerado es reducido sustancialmente.

31.- El procedimiento de la reivindicación 30, en que además dicha etapa de calentamiento a aproximadamente 80°C es aplicada para reducir el contenido de humedad de dicho aglomerado desde un contenido de sólidos de 12% hasta un contenido de sólidos de 46%, ambos  
15 en peso.

32.- El procedimiento de la reivindicación 1, en que el calentamiento del zumo producido por la etapa de compresión se realiza durante un periodo de duración menor de 20 segundos y en que se hace que la temperatura de dicho zumo quede dentro del margen entre  
20 60 y 70°C.

33.- El procedimiento de la reivindicación 32, en que además dicha etapa de calentamiento tiene una duración menor de un segundo y hace que la temperatura  
25



403207

~~707207~~



-2 OCT 1974

de dicho zumo quede dentro del margen de 60 a 70°C.

5 34.- El procedimiento de la reivindicación 32, en que además dicha etapa de calentamiento tiene una duración de 0,5 a 1,0 segundos y hace que la temperatura de dicho zumo quede dentro del margen de 60 a 70°C; y mantener la temperatura de dicho zumo después de dicha etapa de calentamiento durante un periodo no superior a 20 segundos.

10 35.- El procedimiento de la reivindicación 32, en que además dicha etapa de calentamiento tiene una duración de 0,6 segundos y hace que la temperatura de dicho zumo sea de 70°C.

15 36.- El procedimiento de la reivindicación 32, en que además dicha etapa de calentamiento tiene una duración menor de 10 segundos y hace que la temperatura de dicho zumo quede dentro del margen de 60 a 70°C; y se proporciona dicho enfriamiento subsiguiente durante un periodo no superior a 15 segundos.

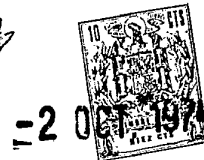
20 37.- El procedimiento de la reivindicación 34, en que además, después de dicha etapa de mantenimiento de la temperatura de dicho líquido, se proporciona dicho enfriamiento subsiguiente durante un periodo de tiempo no superior a 15 segundos.

25 38.- El procedimiento de la reivindicación 35, en que además, después de dicha etapa de calentamiento

30-9-74

403207

~~303207~~



to, se proporciona dicho enfriamiento subsiguiente durante un periodo de tiempo no superior a 15 segundos.

39.- Un procedimiento para fraccionar material vegetal foliáceo verde.

5

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

Esta Memoria consta de treinta y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

-2 OCT. 1974

P.A.

Alberto de Eizoburu  
Por Poderes

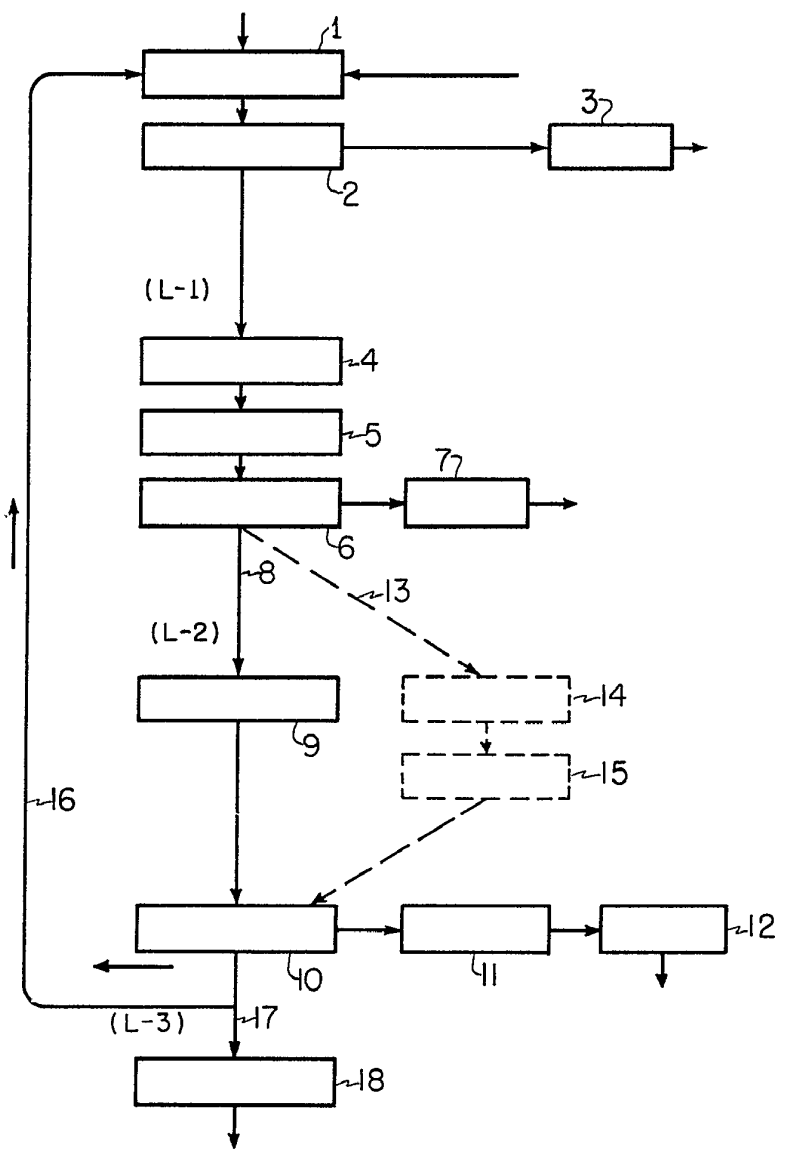
30-9-74  
VGD.

- 39 -





403907



Albert J. ...  
Per ...