

Int. CIA: A23J, A23G

432861

**CONCEDIDA**

14 OCT. 1976

**MEMORIA DESCRIPTIVA**

correspondiente a la solicitud de concesión de una

PATENTE DE INVENCION

SOLICITANTE: UNILEVER N. V.

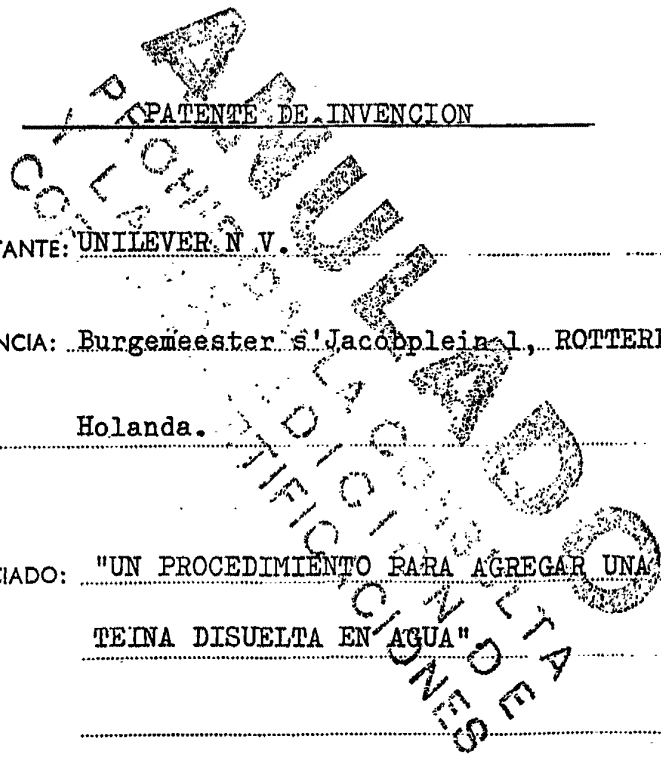
RESIDENCIA: Burgemeester s'Jacobsplein 1, ROTTERDAM,  
Holanda.

ENUNCIADO: "UN PROCEDIMIENTO PARA AGREGAR UNA PRO-  
TEINA DISUELTA EN AGUA"

Prioridad: Patente	británica	n.º	57847/73	del	13-12-73
"	"	Nº	14986/74	"	4-4-74
"	"	"	38281/74	"	2-9-74
"	"	"	50032/74	"	19-11-74.-

AR.-

**BAD ORIGINAL**



1           Esta invención se refiere a un nuevo procedimiento que  
utiliza polisacáridos.

5           Las proteínas y los polisacáridos son dos importantes  
clases de polímeros naturales. Desde hace mucho tiempo se sa-  
be que sus interacciones son importantes, por ejemplo, en  
10           los productos alimenticios. Generalmente estos han contenido  
polisacáridos cargados. Se ha encontrado, como ya se descri-  
be en general en las memorias que acompañan a nuestras soli-  
citudes pendientes, que ciertos polisacáridos ejercen efec-  
tos sorprendentemente intensos sobre las proteínas. Esto es  
especialmente sorprendente porque los polisacáridos son neu-  
tros. Esta memoria explica mejor la invención. Los polisacá-  
ridos afectan a las características de solubilidad de las  
15           proteínas y, en general, aumentan su tendencia a agregarse,  
en especial cuando se calientan. La agregación puede ser vi-  
gilada por medios ópticos. Con frecuencia, la agregación de  
las proteínas hace que precipiten o floquen.

20           Las mezclas de polisacáridos que ejercen este efecto  
hasta un grado tan sorprendente se obtienen desramificando  
la amilopectina o una maltodextrina con un ED bajo (equiva-  
lente de dextrosa inferior a 25) utilizando una  $\alpha$ -1,6-gluco-  
sidasas exenta de  $\alpha$ -1,4-glicosidasas.

25           La invención proporciona un procedimiento en el que  
la agregación de una proteína en solución acuosa es inducida  
por la maltodextrina de ED bajo desramificada disuelta o la  
amilopectina desramificada.

30           Se cree que los polisacáridos que son responsables de  
este efecto son poliglucosidos esencialmente lineales que  
contienen de 20 a 80 unidades de glucosa y especialmente los  
que contienen de 30 a 55 unidades de glucosa. La importancia

1 particular de estos poliglucosidos, por ejemplo en la amilo-  
pectina desramificada, ha sido demostrada por fraccionamiento  
de la amilopectina desramificada empleando cromatografía nor-  
mal en columna de gel y la medida del número de unidades de  
5 glucosa en los poliglucosidos en fracciones especialmente acti-  
vas, por el método enzimático descrito por Manners y colabo-  
radores en Carbohydrate Research, 1971, 17, 109. Se cree que  
para que las mezclas de polisacáridos presenten este efecto  
en un grado útil deben contener, en peso, por lo menos un 2 %  
10 y preferiblemente por lo menos un 10 % de poliglucosidos linea-  
les de 30 a 55 unidades de glucosa.

La invención también proporciona un procedimiento en el  
que es inducida la agregación de una proteína en solución acuosa  
mediante una mezcla disuelta de polisacáridos que contiene,  
15 en peso, por lo menos un 2 % de poliglucosidos lineales de 30  
a 55 unidades de glucosa.

Las mezclas adecuadas de polisacáridos pueden ser obtenidas,  
como se ha explicado, tratando la amilopectina o una  
maltodextrina de ED bajo con una  $\alpha$ -1,6-glucosidasa. Por lo me-  
20 nos en principio, pueden prepararse mezclas comparables por  
fraccionamiento de los hidrolizados de almidón o de fracciones  
de almidón o por síntesis.

Aunque se cree que los responsables de los notables  
efectos observados son los poliglucosidos comprendidos dentro  
de un estrecho intervalo de números de unidades de glucosa por  
molécula, también se ha observado que las mezclas de sacáridos  
que contienen solamente un estrecho intervalo de poliglucosi-  
dos suelen tener poca solubilidad en agua. La presencia de un  
25 amplio intervalo de poliglucosidos aumenta la solubilidad glo-  
bal. Como son los poliglucosidos en solución los que afectan  
30

1 a las proteínas, es ventajoso disponer de otros poliglucosidos  
presentes además de los poliglucosidos estrechamente defini-  
dos. Estas mezclas de poliglucosidos se obtienen desramifican-  
do la amilopectina o las maltodextrinas de ED bajo y por cual-  
5 quier método concebible comercialmente factible de fracciona-  
miento de hidrolizados de almidón o de fracciones de almidón  
o métodos de síntesis.

La cantidad de mezcla de polisacáridos requerida depen-  
de de muchos factores entre los que se encuentran el tipo y  
10 la cantidad de proteína, la mezcla de polisacáridos empleada,  
el grado deseado de efecto y la presencia y la cantidad de  
otros ingredientes, por ejemplo sales. Las cantidades apropia-  
das pueden ser fácilmente determinadas por sencilla experimen-  
tación.

15 La temperatura constituye un factor significativo en  
la determinación del grado de agregación producido. Un impor-  
tante resultado de la invención es permitir que se produzca  
una mayor agregación a temperaturas sorprendentemente bajas.  
En la mayoría de los casos, todavía se requieren temperaturas  
20 superiores a la ambiente, 17°C. La temperatura mínima apropia-  
da puede ser determinada fácilmente mediante un sencillo expe-  
rimento. Naturalmente, se sabe que el calor produce la agrega-  
ción de las proteínas y, por ello su precipitación o flocula-  
ción, pero mediante el uso de esta invención pueden utilizarse  
25 temperaturas sorprendentemente bajas. En lo que se refiere a  
las proteínas como la caseína, la presencia de la mezcla de  
polisacáridos hace que las proteínas precipiten al calentar.  
La agregación de la caseína es normalmente insuficiente para  
producir la precipitación incluso hirviendo en solución acuo-  
30 sa. Las temperaturas adecuadas para la caseína en un procedi-

1 miento de acuerdo con esta invención son solamente de 50°C.

El procedimiento de esta invención es de especial importancia en la manufactura de alimentos donde es importante la aceptabilidad de los polisacáridos. Sin embargo, su utilidad no se limita a este campo. Son ejemplos de uso de la invención la floculación de materiales, por ejemplo en los efluentes, utilizando proteínas y mezclas de sacáridos; influencia sobre la estabilidad de dispersiones no grasas; y la preparación de productos lácteos tales como quark y yogur.

10 Entre los productos alimenticios cuyas propiedades pueden ser afectadas mediante el uso de este procedimiento se encuentran, en general, las emulsiones grasas acuosas que contienen proteínas y contienen o son capaces de contener una fase gaseosa dispersa. La invención es especialmente aplicable a estos sistemas. La crema batida y los helados son ejemplos de estas emulsiones grasas acuosas que contienen una fase gaseosa dispersa. Es sabido que la calidad del producto final, en las emulsiones que contienen la fase gaseosa dispersa, puede ser afectada de diversas formas. Por ejemplo, pueden agregarse estabilizantes para impedir la coalescencia de la grasa y, en el helado, el desarrollo de cristales de hielo. Son ejemplos de estos estabilizantes los polisacáridos de cadena larga. También pueden añadirse emulgentes. Se cree que estos ayudan simplemente favoreciendo la emulsificación de la grasa en la fase acuosa. Ahora creemos que, por lo menos para algunos emulgentes, su efecto más importante es provocar el arracimamiento de las gotitas de grasa. racimos que conducen a la coalescencia de la grasa cuando la emulsión se bate o después de batir. Aunque puede haber presentes estabilizantes para evitar una coalescencia indebida de la grasa se reconoce que es

1 necesario un cierto grado de esta coalescencia para obtener  
buenas características del producto.

5 Ahora se ha encontrado que el uso de esta invención  
produce unos efectos sorprendentemente potentes sobre la es-  
tabilidad de estas emulsiones grasas acuosas que contienen  
proteínas y una fase gaseosa dispersa, especialmente cuando  
la fase gaseosa ha sido incorporada después del tratamiento  
término: tal como esterización, de la emulsión que contiene  
las proteínas. Las proteínas, por ejemplo la caseína, pueden  
10 ser obligadas a agregarse y después a precipitar. La caseína  
agregada o precipitada desestabiliza a las gotitas de grasa  
haciendo que formen racimos y que finalmente se unan. Esto  
influye intensamente sobre la estabilidad del sistema, espe-  
cialmente cuando se introduce un gas. La cantidad de mezcla  
15 de polisacáridos utilizada de acuerdo con la invención depen-  
derá de muchos factores, como ya se ha dicho. En una emulsión  
grasa acuosa, dependerá en especial de las características de  
estabilidad requeridas. Por ejemplo, en el helado, se produ-  
ce un aumento de la estabilidad de la fase gaseosa dispersada  
20 a medida que se añaden pequeñas cantidades de la mezcla de  
polisacáridos. debido a la mayor desestabilización de la gra-  
sa pero a medida que se añade más mezcla de polisacáridos y  
se produce una mayor desestabilización de la grasa, disminu-  
ye la estabilidad del producto.

25 Las 1,6-glucosidasas y su acción sobre el almidón,  
sobre las fracciones de almidón y sobre otros polisacáridos  
están descritas en diversas publicaciones, por ejemplo: pa-  
tentes estadounidenses 3.532.602, 3.535.023, 3.556.942 y  
3.790.446; patentes británicas 1.313.422, 1.268.443 y  
30 1.313.421 y la publicación de patente alemana 1.916.726. Las

1 1,6-glucosidasas adecuadas, especialmente cuando están libres  
de cantidades excesivas de otras sacaridasas, para uso en la  
preparación de los polisacáridos empleados en esta invención,  
pueden ser aisladas de muchas fuentes entre las que se encuen  
5 tran las plantas y en especial los siguientes microorganismos  
(las publicaciones dan el método para su aislamiento): Aero-  
bacter aerogenes U-58, ATCC 9621 y ATCC 15050 (patente esta-  
dounidense 3.654.088), Cytophaga NCIB 9497 (patente británi-  
ca 1.048.887 y estadounidense 3.790.446) y Pseudomonas amylo-  
10 deramosa ATCC 21262, Escherichia intermedia ATCC 21073,  
Streptomyces diastatochromogenes IFO 3337, Actinomyces glo-  
bisporus IFO 12208, Nocardia asteroides IFO 3384, Micromonos-  
pora melanospora IFO 12515 y Thermonospora viridis IFO 12207  
(patente británica 1.313.422).

15 Una fuente preferida de  $\alpha$ -1,6-glucosidasa es la Cyto-  
phaga NCIB 9497. Esta es una especie del género Cytophaga y  
ha sido depositada por Glaxo Ltd en la National Collection  
of Industrial Bacteria, Aberdeen, Escocia, bajo el número  
9497. Está descrita en la patente británica 1.048.887 y en la  
20 estadounidense 3.330.738 y su producción de una  $\alpha$ -1,6-glucosida-  
dasa está descrita en la patente estadounidense 3.790.446.  
Una ventaja del uso de la Cytophaga NCIB 9497 para producir  
la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa es que la produce prácticamente exenta  
de otros enzimas que actúan sobre la amilopectina o los frag-  
25 mentos de amilopectina. Por lo tanto, la amilopectina y las  
maltodextrinas de ED bajo pueden ser desramificadas con des-  
composición despreciable o simultánea de cualquier amilosa o  
fracciones de amilosa presentes. (Por razones de claridad,  
debe observarse que la amilopectina desramificada empleada  
30 en el procedimiento de acuerdo con esta invención puede haber

1 y casi siempre habrá sido preparada a partir de amilopectina  
que contiene algo de amilosa. La amilosa actuará simplemente  
como diluyente. Para obtener un rendimiento lo más alto posi-  
ble de poliglucosido de 20 a 80 unidades de glucosa, la can-  
5 tidad de amilosa debe ser lo más baja posible. El material de  
partida es el almidón de maíz céreo, ya que contiene una gran  
proporción de amilopectina. Con las maltodextrinas de bajo  
ED, la amilosa y las fracciones de amilosa presentes actuarán  
análogamente sólo como diluyente. Se cree que las maltodextri-  
10 nas de ED bajo son preparadas por licuefacción de un almidón  
que contiene una gran proporción de amilopectina y posterior  
hidrólisis empleando amilasa hasta el valor ED deseado. Pero  
cualquiera que sea el método de preparación, las maltodextri-  
nas de ED bajo son productos conocidos vendidos como tales  
15 por muchas compañías).

Otra ventaja del uso de Cytophaga NCIB 9497 es que  
puede ser empleada para producir las mezclas de sacáridos re-  
queridas directamente, sin aislar la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa. Esto  
puede conseguirse cultivando la Cytophaga NCIB 9497 emplean-  
20 do amilopectina o una maltodextrina de ED bajo como fuente de  
energía de sacáridos primaria o incluso única.

La especificidad de las  $\alpha$ -1,6-glucosidasas difiere de  
unas a otras. Por ejemplo, la pululanasa puede separar restos  
de maltosilo (cadenas laterales cortas) de la amilopectina  
25 degradada; la  $\alpha$ -1,6-glucosidasa producida por Cytophaga NCIB  
9497 no puede. Siempre que el enzima o el sistema de enzimas  
tenga actividad  $\alpha$ -1,6-glucosidasa, es decir, desramifique a  
la amilopectina o a la maltodextrina de ED bajo y no ejerza  
ningún otro efecto hidrolítico sobre la amilopectina o la mal-  
30 todextrina de ED bajo o sobre los productos, puede ser utili-

1      zada. Las diferencias de especificidad pueden conducir a lige-  
ras diferencias en los productos finales. Por ejemplo, a par-  
tir de las maltodextrinas de ED bajo, pueden esperarse algunos  
5      poliglucosidos con restos de unidades maltosilo después de des-  
ramificar con  $\alpha$ -1,6-glucosidasa procedente de Cytophaga NCIB  
9497. La presencia de pequeñas cantidades de estos materiales  
no afecta significativamente a la utilidad de los productos.

La invención será ilustrada ahora mediante los siguien-  
tes ejemplos:

10

EJEMPLO 1

Preparación de maltodextrina desramificada

15

Se disuelven 50 g de maltodextrina ED 12 en 1 litro de  
regulador de acetato, pH 5,5 (acetato sódico 100 mM ajustado  
a pH 5,5 con ácido acético 50 mM). Se añade 1,6-glucosidasa  
cruda extraída de Cytophaga NCIB 9497 para dar una relación  
de enzima a sustrato de 1:50. La mezcla se incuba a 37°C du-  
rante 24 horas, hasta que la desramificación es completa, y  
el producto se liofiliza.

20

Incorporación de maltodextrina desramificada al helado

Se añade maltodextrina ED 12 desramificada al helado,  
en una proporción de 0,5 %, como sustituto parcial de la saca-  
rosa. La mezcla de helado se pasteuriza a 70°C durante 20 minu-  
tos y se procesa en el congelador de la forma normal.

25

La formulación típica de helado utilizada es:

30

Agua	63,56 %
Sólidos de la leche	9,48 %
Aceite de palma	9,45 %
Sacarosa	14,38 %
Goma de algarroba	0,18 %
Jarabe de maíz ED 42	1,92 %

1	Emulgente	0,50 %
	Aroma/color	0,03 %
	Maltodextrina desrami- ficada	0,50 %

5 Los resultados sobre los ensayos patrón de retención de la forma y fusión son:

Helado	Retención de la forma <sup>*</sup>	Fusión <sup>*</sup>
Helado típico	53 %	10 ml/hora
10 Helado típico conteniendo maltodextrina desramificada	70 %	0,5 ml/hora

<sup>\*</sup> Determinada en la forma descrita en la patente holandesa 73/17072.

EJEMPLOS 2 y 3

15 Preparación de amilopectina desramificada

Se disuelven 5 g de amilopectina en 1 litro de regulador de acetato a pH 5,5, calentando a 90°C durante 10 minutos. Se enfría la solución y se añade el enzima como se ha descrito para la maltodextrina desramificada hasta dar una relación de enzima a substrato de 1:50. Se deja que la desramificación se produzca a 37°C durante 24 horas. El producto se liofiliza.

20 Incorporación de maltodextrina desramificada (Ejemplo 2) e  
incorporación de amilopectina desramificada (Ejemplo 3) a un  
 25 helado sencillo

La maltodextrina ED 12 desramificada, preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1, se añade a una crema láctea sencilla (18 % de grasa) como sólido liofilizado, a razón de 0,2 %. La amilopectina desramificada, preparada como se ha descrito antes se añade a razón de 0,05 %. La crema se pasteriza a 60°C durante 10 minutos, se enfría a 5°C y se ba-

1 te a 5°C en una mezcladora Kenwood.

Resultados

Control - Se obtiene un 200 % de desbordamiento al ca-  
bo de un tiempo de batido de 30 minutos

5 Crema + maltodex- - Se obtiene un desbordamiento del  
trina ramificada 200 % al cabo de un tiempo de ba-  
(Ejemplo 2) tido de 5 minutos

10 Crema + amilopectina - Se obtiene un desbordamiento del  
desramificada (Ej.3) 200 % después de un tiempo de  
batido de 5 minutos.

Con la muestra de control, el batido prolongado produ-  
ce una disminución del desbordamiento, mientras que en ambos  
ejempl s los productos son estables.

EJEMPLO 4

15 Se obtienen resultados similares a los del Ejemplo 3  
si se emplea amilopectina desramificada, preparada como se  
describe más adelante, en lugar de como se describe en los  
Ejemplos 2 y 3.

20 En medio de cultivo, cuya composición se da más adelan-  
te, se inocula con Cytophaga NCIB 9497 y se incuba a 30°C du-  
rante 4 días. Se obtiene un gran rendimiento de amilopectina  
desramificada centrifugando las células de Cytophaga y liofi-  
lizando el líquido que sobrenada.

La composición del medio de cultivo es (% en peso):

25	Amilopectina*	1
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,5
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
	NaCl	0,01
30	CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,01

1	MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,00225
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,00036
	Acetato de Zn.2H <sub>2</sub> O	0,00020
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00012
5	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,002
	Agua de gran pureza (con teniendo NaOH para lle var el pH total a 7,4) hasta	1000

\* Almidón especialidad copo de nieve 30200 (B9101), Corn Products Corp.

EJEMPLOS 5 y 6

La Tabla I muestra la agregación de caseína y proteína de soja, medida por difusión de la luz, inducida por la maltodextrina desramificada de ED bajo y la amilopectina desramificada.

El Ejemplo 5 contiene 1 % de caseína más 0,5 % de amilopectina desramificada. El Ejemplo 6 contiene 1 % de caseína más 0,5 % de maltodextrina desramificada de ED bajo. El control A contiene 1 % de caseína.

El Ejemplo 7 contiene un 1 % de proteína de soja más 0,5 % de maltodextrina desramificada de ED 12.

El control B contiene 1 % de proteína de soja.

TABLA I

Temperatura, °C	% de luz difundida				
	Ej. 5	Ej. 6	Control A	Ej. 7	Control B
25	42	42	42	41	38
35	45	48	41	50	38
40	52	85	40	55	39
60	75	80	38	68	40
80	58*	75*	37	81	42

1 \* Se reduce la difusión de la luz al aumentar la temperatura probablemente debido a que se forman agregados mayores.

EJEMPLO 8

5 La Tabla II muestra el efecto que tiene la maltodextrina desramificada de ED bajo sobre la proteína de suero.

TABLA II

Tiempo de calefacción (minutos) a 75°C	% de luz difundida	
	Ejemplo 8	Control
10 0	44	44
5	75	43
10	79	45
20	85	50

15 El Ejemplo 8 contiene 0,5 % de proteína de suero más 0,5 % de maltodextrina desramificada de ED 12.

El control contiene 0,5 % de proteína de suero.

En resumen, la Patente de Invención que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

20 1. Un procedimiento para agregar una proteína disuelta en agua, en el que la agregación es inducida por una mezcla de polisacáridos disuelta que contiene, en peso, por lo menos un 2 % de poliglucosidos lineales de 30 a 55 unidades de glucosa.

25 2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, en el que la mezcla de polisacáridos contiene por lo menos un 10 % de los poliglucosidos lineales.

30 3. Un procedimiento según las Reivindicaciones 1 o 2, en el que la mezcla de polisacáridos tiene los mismos constituyentes lineales que una amilopectina desramificada o una maltodextrina desramificada de ED bajo.

1           4. Un procedimiento para agregar una proteína disuelta en agua, en el que la agregación es inducida por una amilopectina desramificada o una maltodextrina desramificada de ED bajo.

5           5. Un procedimiento según las Reivindicaciones 3 o 4, en el que la amilopectina desramificada o la maltodextrina desramificada de ED bajo es una amilopectina o una maltodextrina de ED bajo desramificadas utilizando un enzima o un sistema de enzimas que posee actividad  $\alpha$ -1,6-glucosidasa.

10          6. Un procedimiento según la Reivindicación 5, en el que el enzima o el sistema de enzimas con actividad  $\alpha$ -1,6-glucosidasa está exento de cualquier otro enzima que posea actividad hidrolítica sobre la amilpectina, la maltodextrina de ED bajo o los productos desramificados.

15          7. Un procedimiento según las Reivindicaciones 5 o 6, en el que el enzima o el sistema de enzimas es producido por Cytophaga NCIB 9497.

20          8. Un procedimiento según la Reivindicación 7, en el que la amilopectina desramificada o la maltodextrina desramificada de ED bajo es producida cultivando Cytophaga NCIB 9497, empleando amilopectina o maltodextrina de ED bajo como fuente de energía de sacáridos primaria o única.

25          9. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en el que la proteína es caseína y se utiliza calor para contribuir a inducir la agregación.

30          10. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes reivindicaciones, en el que se emplea la mezcla de polisacáridos en cantidad suficiente para producir la precipitación o floculación de la caseína.

11. Un procedimiento según cualquiera de las precedentes

1 tes reivindicaciones, en el que la agregación de la proteína  
tiene lugar en presencia de grasa emulsionada.

5 12, Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:  
"UN PROCEDIMIENTO PARA AGREGAR UNA PROTEINA DISUELTA EN -  
AGUA".

10 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente Memoria descriptiva que consta de quince páginas  
mecanografiadas.

Madrid, 12 de Diciembre de 1.974

BERNARDO UNGRIA

p.p.  


15

20

25

30