

434912 21 MAR. 1975
P.- 59.793
JMS-CHANDLER-
1

Int. Cl.:
A23L

MEMORIA DESCRIPTIVA

PARA SOLICITAR

PATENTE DE INVENCION

a nombre de COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH
ORGANISATION,

entidad australiana,

establecida en Limestone Avenue, Campbell, en el territorio
de la capital australiana, Australia,

por: "UN METODO DE SEPARAR LIMONINA DE ZUMO DE FRUTAS".

(Clase Internacional A23L)
CONCEDIDA
25 NOV. 1976

Este invento se refiere al tratamiento de zumos de frutas, particularmente zumos de frutas cítricas, para reducir su amargor por adsorción de los principios amargos de los zumos.

5 El amargor de las frutas cítricas y sus productos se debe a los principios limonoides, predominantemente la limonina, y/o a los principios flavonoides predominantemente la naringina y la neohesperidina. Estos principios han sido discutidos generalmente por J.F. Kefford y B.V. Chandler en
10 los Capítulos 13 y 14 de "The Chemical Constituents of Citrus Fruits" (Academic Press - 1970).

La distribución de los principios amargos limonoides y flavonoides varía de unas frutas a otras. En las naranjas dulces, tales como las naranjas Navel, abundan generalmente los limonoides, pero las naranjas de Sevilla (empleadas para mermeladas) tienen un componente flavonoide dominante. En los limones, los limonoides están presentes con muy poco componente flavonoide, mientras que en las toronjas están presentes ambos, siendo dominantes los flavonoides en el zumo reciente
15 pero siendo más importantes los limonoides en el zumo tratado.
20

Resumiendo, el amargor limonoide se debe a la presencia de la dilactona-limonina, una tetranortriterpenoide de fórmula $C_{26}H_{30}O_8$, que está presente inicialmente en el albedo de las naranjas pero que pasa al zumo de naranja por reposo
25 o calentamiento. A concentraciones de 8-12 ppm, el zumo llega

a tener amargor detectable y en el informe "The Removal of Limonin from Bitter Orange Juice" de B.V. Chandler, J.F. Kefford and G. Ziemelis, en Journal of the Science of Food and Agriculture, Vol. 19, nº. 2, de Febrero de 1.968, páginas 83-86, se muestra que puede efectuarse la eliminación de la limonina por tratamiento del zumo con polvos de poliamida. Se encontró que lo más satisfactorio es un tratamiento de dos etapas porque la adsorción preferencial de los flavonoides, tales como la hesperidina, que contiene grupos fenólicos, por poliamidas interfiere con la eliminación de limonina en un tratamiento de una sola etapa. Sin embargo, una desventaja importante del procedimiento de adsorción con poliamida es que el empleo de adsorbentes en forma de polvo requiere la centrifugación del zumo para obtener suero y pulpa, volviéndose a añadir la pulpa al suero después de que ha sido tratado en último con el adsorbente. Por otra parte, se separa una cantidad sustancial del ácido ascórbico (vitamina C) del zumo de naranja (hasta 30%) y el tratamiento en dos etapas, aunque eficaz, tiene desventajas económicas obvias.

El amargor flavonoide se debe a la presencia de neohesperidosidos de flavonoide (como distinto a rutinoides, que son sustancialmente insípidos). La naringina, un neohesperidosido de flavonona, predomina en la toronja, pero también se encuentra presente con la neohesperidina, otro neohesperidosido, en las naranjas amargas, tales como las naranjas de Sevilla. Una

de las técnicas más recientes para separar el amargor de los flavonoides, descrita en la memoria descriptiva de patente francesa Nº 2.125.539 (de SNAM Progetti S.P.A.), implica el empleo de acción enzimática para convertir la naringina en componentes no amargos. La enzima preferida para esta técnica por los inventores D. Dinelli y F. Morisi es la naringinasa incorporada en ciertos polímeros como soportes o vehículos.

En general, y en contra de la exposición hecha en la introducción de la memoria descriptiva de la patente francesa antes mencionada Nº 2.125.539, el amargor limonoide es el más importante en los productos cítricos tratados.

Es un objeto del presente invento proporcionar una nueva técnica para eliminar el amargor limonoide de los zumos de frutas, particularmente zumos de frutas cítricas, en una operación por etapas o continua, sin las desventajas concurrentes del procedimiento de adsorción con poliamida antes mencionada, principalmente la necesidad de una etapa de centrifugación y la separación concurrente de grandes cantidades de vitamina C del zumo.

Para alcanzar este objeto el presente invento utiliza el descubrimiento de que ciertos materiales no conocidos previamente como adsorbentes, principalmente ésteres de celulosa- que incluyen los sugeridos por D. Dinelli y F. Mo-

rasi como vehículos para las enzimas naringinasa en la separación del amargor flavonoide en la memoria descriptiva de la patente francesa Nº 2.215.539 - pueden emplearse con éxito como adsorbentes, especialmente para la eliminación de limonina del zumo de fruta y que esta adsorción es más selectiva que la obtenida con los polvos de poliamida anteriormente empleados, de modo que se eliminan solamente pequeñas cantidades de ácido ascórbico del zumo.

5
10 Como resultado típico que surge de este invento, las naranjas Navel, actualmente tratadas en una escala relativamente pequeña por su alto contenido en limonina, pueden ahora emplearse en cantidad para la preparación de zumo de naranja, así como prolongar el período de tratamiento del zumo de naranja.

15 De acuerdo con el presente invento se proporciona un método de separación de limonina del zumo de fruta que comprende poner en contacto el zumo de fruta con al menos un adsorbente a base de éster de celulosa. Preferiblemente, el adsorbente a base de éster de celulosa comprende acetato de celulosa y/o acetato-butirato de celulosa.

20 La expresión "zumo de fruta" tal como se emplea a lo largo de esta descripción y en las reivindicaciones anexas incluye no solamente el zumo total recién extraído de la fruta, sino también el zumo total que ha sido tratado adicionalmente por concentración, dilución, mezcla y simila-

res, antes del tratamiento de acuerdo con el presente invento. La expresión abarca además tales zumos totales o elaborados que han sido tratados por adición de agentes de conservación, materiales colorantes y aromatizantes y materiales similares empleados en el tratamiento de zumos de frutas.

Los tratamientos incluidos en el invento presente pueden implicar cualquiera de las técnicas convencionales empleadas en los procedimientos de adsorción.

El adsorbente de acuerdo con este invento está preferiblemente en forma de gel, y está típicamente en una columna. El gel está preferiblemente en la forma de perlas bastantes grandes para ser aplicadas como relleno en columnas y permitir pasar al zumo total a través de los lechos de las perlas en dichas columnas sin centrifugación previa. A modo de ejemplo, se ha encontrado que perlas de tamaños 6,4 1,7 mm de diámetro proporcionan un contacto eficaz entre el zumo y el adsorbente cuando están como relleno en una columna.

Por lo tanto, en este aspecto el presente invento proporciona aparatos para el tratamiento de zumo de fruta que comprende una columna adsorbente que contiene o consiste en al menos un adsorbente a base de éster de celulosa y medios para pasar el zumo de fruta a través de dicha columna.

Aplicando el presente invento, por ejemplo, a zumo de naranja que utiliza una columna de adsorbente

el zumo se extrae de las naranjas empleando un equipo convencional y se tamiza para eliminar las partículas de la corteza interior y las bolsas celulares, empleando también equipos convencionales. El zumo o bien se pasteuriza súbitamente o bien se enfría y almacena durante 24 horas, pasándolo luego a través de una columna del adsorbente. Las partículas en forma de nube; presentes generalmente en el zumo de fruta tamizado convencionalmente, pasan a través de la columna y no se pierden del zumo. El zumo puede luego elaborarse o tratarse por distribución y almacenamiento por métodos convencionales.

El empleo de geles de éster de celulosa en forma de columna de la operación se ilustra por el ejemplo siguiente.

EJEMPLO I

Un tubo de vidrio (50,8 cm de largo x 3,2 cm de diámetro interior) se relleno con cubos de gel de acetato-butirato de celulosa (intervalo de tamaños 12,7-6,4 mm; aproximadamente 26 g en peso seco de acetato-butirato de celulosa). Un zumo de naranja muy amargo que contenía 19,2 ppm de limonina se hizo pasar a través de esta columna a un caudal medio de 2,5 ml/minutos. De este modo se obtuvieron 900 ml de un zumo de amargor escasamente detectable (limonina 8,8 ppm).

Como se ha descrito previamente de forma general, cuando se emplea la forma de columna de la operación del presente invento, es preferible que la columna esté for-

mada por perlas de gel muy activas de material de éster de celulosa. En resumen, estas perlas muy activas pueden prepararse conformando, a una temperatura elevada, una dispersión de una solución del material de éster de celulosa en un líquido con el cual es inmisible la solución, enfriando la dispersión y separando las perlas del material de éster de celulosa del líquido. En una técnica alternativa, estas perlas pueden prepararse por una técnica de "torre de caída" que comprende formar una solución del material de éster de celulosa y verter la solución en un líquido con el cual es inmisible dicha solución.

La preparación y el empleo de perlas de gel altamente activas de material de éster de celulosa en forma de columna de la operación se ilustra por el ejemplo siguiente.

EJEMPLO 2.

Se disolvió acetato de celulosa (6 g) en disolvente caliente (30 ml) de dimetilformamida más 13 ml de agua). La solución caliente se vertió luego sobre aceite de petróleo (900 ml) a aproximadamente la misma temperatura que la solución de acetato de celulosa. Por agitación, la solución de acetato de celulosa se dispersó en glóbulos. Al enfriar la dispersión (por ejemplo, por adición de agua) los glóbulos se transformaron en perlas de gel de acetato de celulosa. Se añadieron inicialmente al aceite 10 ml de detergente de "Teepol" para evitar que los glóbulos se peguen unos

a otros mientras transcurría la transformación. Se filtraron las perlas de gel del aceite, se lavaron con solución de detergente para separar el aceite adherido, y luego se enjuagaron y lavaron con agua para separar por lixiviación el disolvente de las perlas. Las perlas se obtuvieron en los tamaños; mayores de 6,4 mm de diámetro, 1 ml; 6,4-1,7 mm de diámetro, 40 ml; más pequeñas que 1,7 mm de diámetro, 5 ml.

Una columna de vidrio de 39 mm de diámetro interno y 150 cc de volumen de lecho (VL) se relleno con las perlas de acetato de celulosa (Ac) (1,7-6,4 mm de diámetro). El peso de las perlas que ocupaba el VL era 93 g del cual 16 g era AC y 77 g era agua, es decir AC:agua = 1:4,8. Un zumo amargo (A) con contenido en limonina inicial de 29 ppm y contenido en azúcar 9,8° Brix se pasó a través de un tamiz de 0,508 mm para separar las partículas más gruesas, y luego se pasó ascendentemente a través del lecho de gel a una velocidad de 2,1 VL/hora (5 cc/minuto). Siendo menos densa que el zumo, el agua contenida en las perlas tendía a flotaren forma de capa en la parte superior del zumo y pasar así como el efluente inicial de la parte superior de la columna. Después de que hubo pasado 1 VL a través de la columna, los grados Brix del efluente eran 8,7°, y después de otro VL, 9,8°. El primer VL del efluente se desechó, y se recogieron los 7 volúmenes de lecho siguientes del efluente, dando 1055 cc de zumo con un contenido total de limonina de 15,1 ppm. Así se alcan-

z6 una reducci3n del 48% en limonina en una producci3n de zumo de 50 cc/minuto. El contenido de limonina del efluente aument3 progresivamente durante el recorrido, desde 13,6 ppm en el primer VL recogido a 16,6 en el 3ltimo. Un lavado sencillo con 7 VL de agua destilada fue suficiente para volver a activar el lecho de gel antes de las pruebas experimentales con otros dos zumos (B y C), que dieron los resultados recogidos en la Tabla I siguiente.

Tabla I

| | <u>Zumo A</u> | <u>Zumo B</u> | <u>Zumo C</u> |
|---|---------------|---------------|---------------|
| N3mero de vol3menes de lecho pasados a trav3s | 7 | 8 | 11 |
| Volumen de zumo tratado (cc) | 1050 | 1200 | 1650 |
| Contenido inicial en limonina del zumo (ppm) | 29,0 | 30,8 | 34,7 |
| Contenido en limonina del primer VL (ppm) | 13,6 | 11,6 | 8,8 |
| Contenido en limonina del VL final (ppm) | 16,6 | 25,6 | 18,7 |
| Contenido global en limonina del efluente (ppm) | 15,1 | 18,4 | 15,0 |
| Separaci3n de la limonina (%) | 48 | 40 | 57 |

Aunque las perlas de gel del material de 3ster de celulosa se emplean convenientemente en las columnas, tambi3n pueden utilizarse en operaciones discontinuas. Se ha encontrado que estas perlas pueden emplearse eficazmente en tratamientos discontinuos cierto n3mero de veces, regener3ndose su actividad entre los empleos simplemente por enjuagado

en agua. El volumen de agua empleado para la regeneración debe ser mucho mayor que el volumen de zumo tratado, si la actividad inicial de las perlas ha de ser restablecida totalmente. Las perlas pueden encerrarse convenientemente en, por ejemplo, bolsas de malla de nylon.

El empleo de perlas de gel del material de éster de celulosa en el tratamiento discontinuo de zumo se ilustra en los ejemplos siguientes:

EJEMPLO 3

La Tabla 2 siguiente presenta los resultados de tres experimentos en los que se emplearon perlas de gel de acetato de celulosa (AC:agua = 1:5,6) para quitar el amargor del zumo de naranja agitando moderadamente las perlas con el zumo durante 45 minutos. Se observa que puede ser deseable llevar a cabo etapas para evitar la deterioración oxidante del zumo durante este procedimiento pero no es esencial para el tratamiento de quitar el amargor. Los resultados recogidos en esta Tabla se obtuvieron en ensayos llevados a cabo en una atmósfera de nitrógeno. Similarmente, se observa que también puede ser deseable llevar a cabo el procedimiento a temperatura reducida; los resultados recogidos se obtuvieron con zumo a temperatura ambiente.

Tabla 3

| | <u>Experimento A</u> | <u>Experimen- to B</u> | <u>Experimen- to C</u> | |
|----|--|----------------------------|----------------------------|-------|
| 5 | Contenido inicial en limonina del zumo (ppm) | 22,6 | 20,7 | 19,1 |
| | Contenido final en limonina del zumo (ppm) | 12,7 | 13,5 | 15,2 |
| | Separación de limonina (%) | 44 | 35 | 20 |
| | Cantidad de limonina separada (mg) | 1,485 | 1,080 | 0,585 |
| 10 | Contenido en limonina del agua de lavado (ppm) | 2,8 | 3,3 | 4,3 |
| | Cantidad de limonina recuperada (mg) | 0,420 | 0,495 | 0,645 |

15 Sin embargo, de acuerdo con este invento, el adsorbente de éster de celulosa puede emplearse también en forma de polvo para tratamientos discontinuos del zumo en forma similar a los tratamientos de polvo de poliamida antes citados. Los polvos de éster de celulosa poseen la ventaja de que un tratamiento de una sola etapa es muy adecuado para quitar el

20 amargor a un zumo de naranja amargo, mientras que un tratamiento de dos etapas puede ser necesario con el tratamiento de polvo de poliamida. Un tratamiento de polvo consiste en una centrifugación preliminar para eliminar componentes tales como partículas en forma de nubes y pulpa fina del suero de

25 zumo. A continuación el suero se sacude o agita moderadamen-

te con adsorbente de polvo de éster de celulosa previamente humedecido. Finalmente, el polvo adsorbente se separa del suero al que se ha quitado el amargor el cual se reúne entonces con los otros componentes del zumo.

5 El ejemplo siguiente demuestra la separación de la limonina de zumos amargos empleando adsorbentes de éster de celulosa en forma de polvo.

EJEMPLO 5

10 Se lleva a cabo una serie de tratamientos de zumos de fruta de acuerdo con el procedimiento general descrito antes empleando adsorbentes de acetato de celulosa o acetato-butilato de celulosa en forma de polvo. Los tratamientos y los resultados obtenidos se tabularon en la Tabla II que muestra

- 15 (a) la eliminación completa del amargor de un zumo de amargor moderado;
- (b) la conversión de un zumo de fuerte amargor en uno de amargor suave, tanto en (a) como en (b) sin pérdidas significantes de ácido ascórbico;
- 20 (c) la conversión gradual de un zumo de fuerte amargor en uno de amargor suave empleando cantidades crecientes de polvo de acetato de celulosa, y
- (d) la eliminación completa del amargor completamente de un zumo de amargor suave empleando muy pequeñas cantidades
- 25 de polvo de acetato de celulosa.

Tabla II

| <u>Polvo de adsorbente</u> | | Limonina inicial (ppm) | Limonina final (ppm) | Acido ascór- bico inicial (mg/100 ml) | Acido as- córbito final (mg/ 100 ml) | |
|----------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|---|---|----|
| Tipo | g/100 ml de suero | | | | | |
| 5 | (a) ABC | 2 | 15 | 7 | 47 | 46 |
| | (b) ABC | 2 | 26 | 11 | 39 | 38 |
| | (c) AC | 0,12 | 23,1 | 16,5 | - | - |
| | (c) AC | 0,18 | 23,1 | 15,3 | - | - |
| | (c) AC | 0,31 | 23,1 | 18,3 | - | - |
| 10 | (c) AC | 0,48 | 23,1 | 14,1 | - | - |
| | (c) AC | 1,08 | 23,1 | 12,3 | - | - |
| | (c) AC | 1,74 | 23,1 | 11,2 | - | - |
| | (d) AC | 0,24 | 12,6 | 8,0 | - | - |
| | (d) AC | 0,46 | 12,6 | 7,4 | - | - |
| 15 | (d) AC | 0,54 | 12,6 | 6,3 | - | - |

ABC: Polvo de acetato-butilato de celulosa (Eastman EAB-381-20),
no humedecido, agitación moderada durante 20 minutos.

AC : Polvo de acetato de celulosa (CSR Chemicals, grado BMF),

20 44-72 mallas, humedecido con hasta 2 ml de agua, agitación mo-
derada durante 45 minutos.

25 Será evidente para los expertos en la técnica que
estos resultados demuestran que la eliminación completa del amargor
puede obtenerse empleando la cantidad requerida de adsorbente, que

depende del amargor inicial del zumo.

5 El tratamiento de polvo antes descrito implica una centrifugación preliminar para separar el suero del zumo de sus otros componentes, siendo luego el suero puesto en contacto con el polvo adsorbente. En un tratamiento alterna-
10 tivo de polvo, puede prescindirse de esta centrifugación preliminar si el polvo de éster de celulosa está encerrado en, por ejemplo, bolsas de tejido de malla fina tal como nylon y se emplea luego en tratamientos discontinuos similares a los descritos antes, empleando perlas de gel de material de éster de celulosa.

La superioridad como adsorbente del polvo de acetato de celulosa sobre un polvo de poliamida se ilustra en el ejemplo siguiente.

15 EJEMPLO 6

La efectividad del polvo de acetato de celulosa y un polvo de poliamida (Polyclar AT) como adsorbente se demuestra en términos de la separación de limonina del zumo de bajo contenido en limonina (8,6 ppm, amargor escasamente detectable); la competencia entre la limonina y los flavonoides para los sitios adsorbentes sería particularmente fuerte en dichos zumos. En este ejemplo, el suero del zumo fue agitado moderadamente durante 45 minutos con los polvos respectivos (72-200 mallas), empleando 0,20, 0,40, 0,80, 1,00 y 2,50 g/100
25 ml de suero. El tratamiento con polvo de acetato de celulosa

redujo el contenido de limonina a 5,0, 4,1, 3,1, 2,6 y 2,4 ppm, respectivamente; el tratamiento con polvo de poliamida redujo el contenido de limonina a 7,4, 7,2, 6,7, 6,0 y 4,8 ppm, respectivamente.

5 En otra técnica para tratar zumos de frutas, que está dentro del alcance de este invento, el zumo se extrae de una forma convencional, luego se coloca o almacena en recipientes que están formados por, incorporan o están revestidos con un adsorbente de éster de celulosa tal como un gel de polímero o papel acetilado. Puesto que el amargor aparece en el zumo reciente a las 24 horas, se adsorberá en el material del revestimiento o tratado del recipiente a medida que aparece en el zumo y el zumo puede venderse, sin la preocupación de que esté amargo, dos o tres días después de que ha sido extraído de las naranjas. De acuerdo con este aspecto del invento, el invento proporciona también un recipiente para el manejo y/o almacenamiento de los zumos de frutas caracterizado porque está formado, incorpora o está revestido con un adsorbente de éster de celulosa. Este aspecto del invento se ilustra en los ejemplos siguientes.

10

15

20

EJEMPLO 7

Se disolvió el acetato-butirato de celulosa (5 g) en etanol caliente (40 ml). La mezcla caliente se vertió en una botella de plástico de un litro, la cual había sido girada para dar un revestimiento uniforme de gel en las

25

paredes internas de la botella. Cuando se hubo formado el gel, la botella se enjuagó con agua y se lavó repetidamente para eliminar el disolvente. 500 ml de zumo de naranja intensamente amargo, que había sido tratado con limonina de modo que contenía 42 ppm de limonina, se añadió al recipiente y éste se almacenó bajo refrigeración. Después de tres días, el zumo tenía solamente un ligero amargor, siendo el contenido de limonina de 11 ppm. Será evidente para los expertos en la técnica que este resultado demuestra que el zumo de naranja de amargor normal se quedará completamente exento de amargor por este procedimiento, puesto que el zumo de naranja natural con contenido de limonina superior a 35 ppm es extremadamente raro.

EJEMPLO 8

Se preparó papel de triacetato de celulosa de Whatman Filter Paper N^o. 1 para cromatografía por el método de F.J. Ritter y J. Hartel (J. Chrom. 1. página 461 (1958). Se emplearon tiras de este papel de triacetato de celulosa para revestir latas de estaño lisas empleando "Aradite" como adhesivo. La lata A se revistió con 5,4 g y la lata B con 7,8 g del papel de triacetato de celulosa. El zumo de naranja moderadamente amargo que contenía 14,9 ppm de limonina se colocó en ambas latas (420 ml cada una) y las latas se precintaron y cocieron con giro de la forma usual. Las latas se almacenaron bajo refrigeración. Después de 4 días, el zumo de la

lata A tenía solamente un ligero amargor y contenía 12,3 ppm de limonina. El zumo de la lata B tenía un amargor escasamente detectable y contenía 9,2 ppm de limonina después de 13 días.

5 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en Australia, el 21 de Febrero de 1.974, bajo el número PB.6670, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

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

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 que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

15 1ª). Un método de separar limonina de zumo de fruta que comprende poner en contacto el zumo de fruta con al menos un adsorbente a base de éster de celulosa.

20 2ª). Un método según la reivindicación 1ª, en donde el adsorbente a base de éster de celulosa comprende acetato de celulosa y/o acetato-butirato de celulosa.

3ª). Un método según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en donde el adsorbente a base de éster de celulosa está en forma de perla de gel.

25 4ª). Un método según la reivindicación 3ª, en donde las perlas de gel del adsorbente a base de éster de celulosa están aplicadas como relleno en una columna y el zumo de frutas se hace pasar a través de la columna.

5ª). Un método según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en donde el adsorbente de éster de celulosa está en forma de polvo.

5 6ª). Un método según la reivindicación 5ª, en donde el suero del zumo de fruta se separa de sus otros componentes antes de poner en contacto el suero con dicho adsorbente, y el adsorbente se separa subsiguientemente del suero tratado antes de la reunión del suero tratado con dichos otros componentes.

10 7ª). Un método según las reivindicaciones 1ª ó 2ª, en donde el zumo de fruta está en contacto con dicho adsorbente en un recipiente en que está formado por, incorpora o está revestido con dicho adsorbente.

15 8ª). Un método de separar limonina de zumo de frutas.

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

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

Madrid, 25. OCT. 1976

P.A.

Fernando de Elizaburu

Por Poder.

