



44 1992

P.- 61.599

Dr. 1352

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar PATENTE DE INVENCION

a nombre de INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE

entidad francesa

|           |      |
|-----------|------|
| Int. Cl.: | A23J |
|-----------|------|

establecida en 149, rue de Grenelle, Paris 7ème,  
Francia

por: "UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE PRODUCTOS PURIFICADOS DE AISLAMIENTO DE PROTEINAS".

31.10.75



La presente invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de productos purificados de aislamiento de proteínas, y particularmente de proteínas obtenidas a partir de sustancias proteicas de con  
5 sistencia mucilaginoso, y en particular de proteínas de girasol.

Es sabido que actualmente se investigan nuevas fuentes de proteínas, por un lado para remediar la deficiente nutrición de más de la mitad de la pobla-  
10 ción del mundo, y por otro lado responder a los nuevos mercados resultantes de la evolución de las formas de alimentación en los países industrializados.

Entre las nuevas fuentes de proteínas em  
pleadas actualmente, tales como los vegetales, las algas,  
15 las bacterias y las levaduras, las semillas oleaginosas, y particularmente las de soja, girasol, colza y algodón, son materias primas seleccionables por su abundancia.

Se conocían ya procedimientos de obten-  
ción de proteínas a partir de girasol; puede citarse,  
20 por ejemplo, el procedimiento llamado de precipitación-lavado, descrito especialmente por GHEYASUDDIN, CATER y MATTIL en "Food Technology", vol. 24, página 242 (1970).

Este procedimiento comprende las etapas esenciales siguientes:

25 a) solubilización alcalina de las pro-



teínas contenidas en la torta residual del prensado de girasol, desaceitada, por medio de hidróxido de sodio que contiene sulfito de sodio,

5 b) clarificación de la suspensión así obtenida por centrifugación o decantación, que permite separar la disolución proteica alcalina del residuo sólido, que comprende esencialmente celulosa y hemicelulosas.

10 c) precipitación de las proteínas contenidas en la disolución alcalina por acidificación en el punto isoeléctrico, punto que corresponde al pH para el que la solubilización de las proteínas de girasol es mínima.

15 d) purificación de las proteínas en forma insoluble obtenidas en la etapa anterior, por lavado con agua seguido de centrifugaciones o filtraciones, y después por lavado con alcohol-éter.

Las proteínas citadas así aisladas se secan por ejemplo por liofilización o pulverización.

20 Se obtienen por este procedimiento productos de aislamiento de proteínas de coloración oscura, que se muestran inadecuados para el hilado en fibras a causa de la presencia de sustancias de consistencia mucilaginosa en disolución alcalina concentrada, que obturan las hileras.

25



También se han propuesto procedimientos de obtención de sustancias proteínicas por disolución alcalina y tratamiento con ayuda de cal; pueden citarse a este respecto las patentes de los EE.UU. nos.

5 1.955.375 y 2.233.439, así como la patente francesa nº 975.022, que describen procedimientos de obtención de sustancias proteínicas, útiles especialmente para el re vestimiento de papel, poniendo en práctica etapas de di solución alcalina y tratamiento con cal, en condiciones  
10 tales que las proteínas obtenidas son desnaturalizadas.

Por otro lado, es también conocida la pre paración de productos de aislamiento purificados de pro- teínas de girasol, aptas para el hilado en fibras, por tratamiento con cal de disoluciones de proteínas de gira  
15 sol obtenidas por disolución alcalina de una dispersión acuosa de la torta residual de prensado de girasol, y eli minación del residuo insoluble; la cantidad de cal emplea da se determina, según este procedimiento, de modo que la concentración de CaO en la disolución resultante esté com  
20 prendida entre 2 y 7 g/l; las condiciones de puesta en práctica de este procedimiento, descrito en la solicitud de patente francesa nº 73 29 327, presentada el 10 de agosto de 1973 a nombre de la solicitante, es decir la cantidad de cal empleada, los tiempos de maceración, y  
25 las temperaturas de tratamiento, son tales que los produc

31.10.75



tos obtenidos son productos de aislamiento purificados de proteínas no desnaturalizadas, que son útiles en el campo de la alimentación. Este procedimiento permite la obtención de productos purificados de aislamiento de proteínas, es decir desprovisto de sustancias responsables de la obturación de las hileras, o sustancias de consistencia mucilaginosa; sin embargo, este procedimiento presenta inconvenientes, particularmente en lo referente a la coloración de las proteínas.

5  
10                   En la patente de los EE.UU. nº 2.607.767, se describe igualmente un procedimiento que comprende la adición, a una torta, de una mezcla hecha previamente de hidróxido de sodio y cloruro de calcio en disolución acuosa, y ello con concentraciones preferidas de  $\text{CaCl}_2$  necesariamente muy elevadas, ya que se aproximan a  $10 \cdot 10^{-2}$  M.

15                   Se ha encontrado ahora un procedimiento de obtención de productos purificados de aislamiento de proteínas desprovistos de sustancias de consistencia mucilaginosa y empobrecidos en pigmentos, que evita los problemas de coloración de las proteínas descritos anteriormente.

20                   El procedimiento según la presente invención comprende:

25                   1) poner en suspensión o empastar una torta de sustancia proteica que contiene compuestos de

-7 NOV 1975

consistencia mucilaginosa, con un volumen en litros  
igual a 10 a 15 veces, y preferiblemente 3 a 5 veces,  
el peso en kg. de la torta, de una disolución de una o  
varias sales de metales alcalinotérreos, y entre ellos  
5 el magnesio, que contiene además sulfito de sodio, y aña  
dir a la suspensión o pasta obtenida una disolución con-  
centrada de álcali en cantidad suficiente para permitir  
la solubilización de las proteínas.

2) separar, de manera conocida, el extrac-  
10 to proteico del residuo insoluble,

3) acidificar el extracto de proteínas cla-  
rificado resultante, con ayuda de una disolución ácida  
hasta un pH comprendido entre 4,5 y 5,5, para causar la  
precipitación de las proteínas, y

4) separar de las aguas madres, de modo  
15 conocido, el precipitado proteico formado, sometiéndose  
después a un lavado dicho precipitado proteico.

La sustancia proteica, que contiene com-  
puestos de consistencia mucilaginosa, utilizable según  
20 la invención, se elige entre las fuentes de proteínas ci  
tadas antes. Entre éstas se prefieren muy especialmente  
las proteínas de girasol, y, para mayor claridad de la ex  
posición, en adelante se hará referencia a éstas, sin que  
ello signifique una limitación.

25 La torta residual del prensado de girasol



utilizada en el procedimiento según la invención es molida, ventajosamente, hasta una granulometría media preferiblemente inferior a 1 mm, para que la puesta en suspensión en la disolución de sales sea rápida y estable.

5                   La temperatura de realización del procedimiento según la invención no es crítica; no obstante, la extracción de los constituyentes solubles es más rápida cuando se trabaja a una temperatura comprendida entre aproximadamente 15 y 50°C; sin embargo, y por razones económicas, el procedimiento según la invención puede ponerse en  
10                   práctica ventajosamente a la temperatura ambiente, en cuyo caso la duración de la extracción puede ser sensiblemente más larga.

                  Las sales de metales alcalinotérreos utilizables en el procedimiento según la invención son, particularmente, las sales de calcio, por ejemplo acetato, cloruro, lactato, etc.; estas sales se emplean en combinación  
15                   con una sal de magnesio, como por ejemplo acetato, cloruro, lactato de magnesio, u otras.

20                   La disolución de sales de metales alcalinotérreos preferidas en el procedimiento de la invención es una disolución de acetato de calcio y acetato de magnesio, y aún más ventajosamente una disolución de cloruro de calcio y cloruro de magnesio. La cantidad de disolución final  
25                   de la etapa 1 del procedimiento representa de 10 a 15 ve-



ces, y ventajosamente de 3 a 5 veces, el peso de la torta, estando determinados los contenidos respectivos de sal de metales alcalinotérreos y de sal de magnesio de dichas disoluciones en función del contenido de compuestos de consistencia mucilaginososa de la sustancia de partida, de su contenido de pigmentos y de la pureza deseada en el producto final.

Según la invención se emplea, para solubilizar las proteínas, un álcali cualquiera, como por ejemplo hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o una disolución amoniacal.

La cantidad de álcali empleado permite ajustar el pH del medio de solubilización a un valor comprendido entre 10,5 y 12,5, y preferiblemente entre 11 y 12.

Preferiblemente se emplea un álcali concentrado hasta alcanzar una normalidad de 0,10 a 0,15 N.

En el procedimiento según la invención es útil mantener el pH de la mezcla de torta y disolución salina, en un primer período, en un valor comprendido entre aproximadamente 7 y 8,5, para insolubilizar la fracción de los pigmentos que procede de las cáscaras de la semilla de girasol. Según una variante preferida de la invención, se ajusta pues en un primer período el pH de la suspensión citada a un valor comprendido entre 7 y 8,5,



y preferiblemente 8, se deja macerar durante unos 15 a 30 minutos, se eleva el pH de la disolución resultante hasta un valor comprendido entre 10,5 y 12,5, y después se deja macerar durante unos 15 a 30 min., ventajosamente a temperatura ordinaria.

5

La cantidad de sulfito de sodio empleada en la disolución de sales de metales alcalinotérreos, por ejemplo en la disolución de acetato de Ca y acetato de Mg, es tal que la concentración de sulfito de Na en la pasta está comprendida entre 1 y 2 g/l. Como alternativa, esta misma cantidad de sulfito de Na puede introducirse con la disolución de álcali concentrado, en lugar de estar comprendida en la disolución de las sales alcalinotérreas.

10

El extracto proteico obtenido después de la solubilización de las proteínas y la separación del residuo insoluble se acidifica a continuación hasta un pH comprendido entre 4,5 y 5,5, y preferiblemente entre 5,2 y 5,3. Para esta acidificación se emplea preferiblemente una disolución concentrada de ácido sulfúrico o clorhídrico.

15

Sin embargo, puede emplearse otra disolución cualquiera, tal como fosfórica, acética, láctica o cítrica, para disminuir el pH de la disolución. Este intervalo de pH corresponde a la zona de precipitación óptima de las proteínas, y de mantenimiento en disolución de los pigmentos que eventualmente no se han insolubilizado en el curso de las

20

25



etapas anteriores del procedimiento. El precipitado proteico se separa a continuación de las aguas madres por centrifugación o lavado.

5 Según un modo de realización de la presente invención particularmente preferido desde el punto de vista económico:

a) se forma una pasta, en una disolución de una sal de Ca y una sal de magnesio, con torta de girasol molida hasta una granulometría preferiblemente inferior a 1 mm, representando el volumen de disolución  
10 empleado de 3 a 5 veces el peso de la torta.

b) se añaden a dicha pasta sulfato de sodio y un álcali concentrado, en cantidad tal que la normalidad de dicho álcali esté comprendida finalmente entre  
15 0,10 y 0,15 N, y se deja macerar durante unos 15 a 30 min.,

c) se ajusta eventualmente el pH de la suspensión a un valor comprendido entre 10,5 y 12,5, y preferiblemente entre 11 y 12.

d) se deja macerar esta pasta, y después  
20 se diluye hasta que el volumen total en litros esté en una relación de 10:1 a 15:1 con el peso en kg. de torta empleada,

e) se separa de la disolución, por medios conocidos por se, el residuo insoluble, y se acidifica  
25 la disolución resultante hasta un pH comprendido entre

4,5 y 5,5 para hacer precipitar las proteínas, separándose a continuación el precipitado proteico de las aguas madres por medios conocidos, por ejemplo por centrifugación o lavado.

5 De este modo, según el procedimiento de la invención, el extracto de proteínas obtenido está desprovisto de sustancias de consistencia mucilaginosas y empobrecido en pigmentos. Por lo tanto, el hilado en fibras de las sustancias proteicas así preparadas se facilita, gracias a la ausencia de sustancias mucilaginosas que ocasionan la obturación de las hileras.

10 El precipitado proteico obtenido después de la acidificación del extracto proteico clarificado se leva posteriormente poniéndolo en suspensión en agua, por ejemplo en un volumen de agua igual al del extracto clarificado. Las proteínas lavadas se recogen a continuación por filtración, centrifugación o lavado.

15 Esta operación puede repetirse, y los líquidos de lavado finales pueden emplearse de nuevo para la preparación de las disoluciones de extracción de la etapa 1 del procedimiento.

20 Estas proteínas así obtenidas pueden secarse, por ejemplo por liofilización, atomización, o por secado en lecho fluidizado. En el caso del secado por atomización, la temperatura del aire está comprendida entre 150 y



300°C, y la temperatura del producto seco entre 75 y 95°C.

Los productos purificados de aislamiento son, prácticamente, totalmente solubles en medio alcalino.

5

El grado de purificación puede evaluarse por el enriquecimiento en nitrógeno de las preparaciones. Así, un producto de aislamiento de proteínas de girasol preparado sin purificación contiene de 14 a 14,5% de nitrógeno, mientras que un producto de aislamiento preparado en las mismas condiciones pero con purificación contiene un promedio de aproximadamente 16%, y lo más frecuentemente incluso 16,5% de nitrógeno, determinándose el nitrógeno por el método de KJELDAHL. La aptitud de los productos de aislamiento de proteínas para el hilado en fibras se caracteriza por su solubilidad en hidróxido de sodio. Así, los productos de aislamiento de proteínas según la invención son enteramente solubles en hidróxido de sodio, mientras que la solubilidad de los productos de aislamiento de proteínas obtenidos según el procedimiento llamado de precipitación-lavado es incompleta.

10

15

20

Sin querer atarse a ninguna teoría, se piensa que, según el modo preferido de realización de la invención, la sal de calcio juega un papel doble: en una primera fase, a pH 8, la sal de calcio insolubiliza la fracción

25

27 NOV 1975

de los pigmentos procedente de las cáscaras de la semilla de girasol, y en la segunda fase, de solubilización de las proteínas a pH superior a 10, insolubiliza los compuestos de consistencia mucilaginoso, muy posiblemente por formación de cal in situ, en parte en estado disuelto y en parte en estado de precipitado coloidal, como consecuencia de la reacción entre el álcali y las sales de metales alcalinotérreos.

Igualmente, y en lo referente a la sal de magnesio, se cree que provoca la insolubilización de una parte de los pigmentos a base de ácido clorogénico, por formación de clorogenato de magnesio insoluble.

Por otro lado, el sulfito de sodio se emplea en el procedimiento según la invención como agente antioxidante frente a los polifenoles, y particularmente al ácido clorogénico.

Así pues, el empleo de una sal de magnesio y de sulfito de sodio según el procedimiento de la invención contribuye a la obtención de productos de aislamiento de proteínas muy empobrecidos en pigmentos.

La invención se ilustrará ahora con más detalle por medio de los ejemplos siguientes, que no son limitativos del alcance de la invención.

25

31.10.75



### EJEMPLO 1

En este ejemplo, todas las etapas se han efectuado a temperatura ambiente. Se ponen en suspensión 10 kg de torta residual del prensado de girasol, molida hasta una granulometría de aproximadamente 1 mm, en 100 litros de una disolución de acetatos en la que se han disuelto 150 g de sulfito de sodio, estando constituida la disolución de acetatos por acetato de calcio y acetato de magnesio, siendo la concentración de cada constituyente de 0,02 M. Se añade a esta suspensión sosa concentrada 10 N hasta alcanzar un pH igual a 8 aproximadamente. Se deja macerar la suspensión bajo agitación durante unos 15 minutos. Se añade a continuación sosa concentrada para obtener una normalidad de 0,1, y se deja macerar la mezcla resultante durante 10 a 30 minutos. Se separa a continuación el extracto proteico del residuo insoluble. Al extracto así clarificado se le añade entonces ácido sulfúrico hasta alcanzar un pH de 5; las proteínas precipitadas se separan a continuación y después se lavan. Las proteínas lavadas se secan después por pulverización. El producto contiene 16,7% de nitrógeno.

Ensayos de hilado en fibras realizados a partir de las proteínas obtenidas anteriormente han conducido a resultados satisfactorios, sin que se produjera ninguna obstrucción de las hileras; por otro lado, las fibras

obtenidas tenían una buena resistencia mecánica.

EJEMPLO 2

5                    En este ejemplo se han tratado 10 g de tor  
ta de girasol según el modo operatorio descrito en el  
ejemplo 1, pero sustituyendo el acetato de calcio por  
una cantidad equimolar de lactato de calcio, siendo 100  
ml la cantidad de disolución para formar la suspensión.  
10                   El producto de aislamiento de proteínas así obtenido te-  
nía una coloración clara; contenía 16,5% de nitrógeno y  
no mostraba ningún material insolubilizado en hidróxido  
de sodio.

15                   EJEMPLO 3

                  Se repitió el modo operatorio descrito en  
el Ejemplo 2 empleando, en lugar de lactato de calcio,  
cloruro de calcio en cantidad equimolar. El producto de  
20                   aislamiento de proteínas obtenido contenía 16% de N.

EJEMPLO 4

                  En este ejemplo, todas las etapas se efec-  
25                   tuaron a temperatura ambiente.

Se preparó una pasta de 20 g de torta de girasol, molida a una granulometría de aproximadamente 1 mm, en 70 ml de una disolución de acetato de calcio  $2 \cdot 10^{-2}$  N y acetato de magnesio  $1 \cdot 10^{-2}$  N. Se añadieron a esta pasta, al cabo de 5 minutos de maceración, 0,8 ml de NaOH 10 N y 10 ml de una disolución de sulfito de sodio de 12 g/l, y se trituroó durante 15 minutos. A continuación se añadieron 120 ml de una disolución de sulfito de sodio a 1,5 g/l.

Se separó el extracto proteico del residuo insoluble. Al extracto así clarificado se le añadió entonces ácido sulfúrico hasta alcanzar un pH de 5; las proteínas precipitadas se separaron a continuación, y después se lavaron. Las proteínas lavadas se secaron después por crio-deseccación (liofilización). El producto seco contenía 16,3% de nitrógeno, y no mostraba ningún material insoluble en hidróxido de sodio.

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Francia, el 23 de Octubre de 1974, bajo el N<sup>o</sup> 74 35.594, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

25

31.10.75



para hacer precipitar las proteínas, y 4) separar de las aguas madres, de modo conocido, el precipitado proteico formado, sometiéndolo posteriormente dicho precipitado proteico a un lavado.

5                    2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque la disolución de sales de metales alcalinotérreos es una disolución de acetato, lactato o cloruro de calcio, que contiene además una sal de magnesio, elegida particularmente entre el acetato, el cloruro y el lactato de magnesio.

10                    3ª.- Un procedimiento según una de las reivindicaciones 1ª ó 2ª, caracterizado porque la sustancia proteica que contiene compuestos de consistencia mucilaginosa es el girasol.

15                    4ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 3ª, caracterizado porque la sustancia proteica de girasol se muele a una granulometría media preferiblemente inferior a 1 mm, y el álcali se añade a dicha suspensión en cantidad tal que el pH de la misma esté comprendido entre 7 y 8,5 y preferiblemente sea igual a 8, dejándose macerar la suspensión durante unos 15 a 30 min. con agitación, ajustando el pH de la suspensión a un valor comprendido entre 10,5 y 12,5, y preferiblemente entre 11 y 12, y dejándose macerar de nuevo, con agitación continua o intermitente, la suspensión obtenida, tras lo cual

20

25

se acidifica para hacer precipitar las proteínas y se se para el precipitado proteico de las aguas madres.

5 5ª.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque la sal de metal alcalinotérreo es lactato, acetato o cloruro de calcio y/o de magnesio.

10 6ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracterizado por efectuar las etapas citadas a una temperatura comprendida entre unos 15 y 50°C, y preferiblemente a temperatura ambiente.

7ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 6ª, caracterizado por emplear, como álcali, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o una disolución amoniacal.

15 8ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 7ª, caracterizado porque, para acidificar el extracto proteico, se emplea una disolución normal de ácido sulfúrico, una disolución normal de ácido clorhídrico, o una disolución de otro ácido que permita  
20 disminuir el pH del extracto proteico hasta un valor comprendido entre 4,5 y 5,5, y preferiblemente entre 5,2 y 5,3.

25 9ª.- Un procedimiento según la reivindicación 8ª, caracterizado por emplear una disolución de ácido fosfórico, acético, láctico o cítrico.

10ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 9ª, caracterizado porque comprende además una etapa de secado por liofilización, por atomización o en lecho fluidizado.

5

11ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 10ª, caracterizado porque el sulfito de sodio se emplea en cantidades tales que la concentración de sulfito de Na en la mezcla está comprendida entre 1 y 2 g/l.

10

12ª.- Un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 11ª, caracterizado porque el sulfito de sodio se introduce conjuntamente con la disolución de álcali concentrado.

15

13ª.- UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE PRODUCTOS PURIFICADOS DE AISLAMIENTO DE PROTEINAS.

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

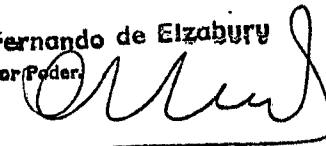
Esta Memoria consta de veinte hojas escritas a máquina por una sola cara.

20

Madrid, 16. MAR 1977

P.A.

Fernando de Elizaburu  
Por Poder



25

15.3.77

JMM/.

- 20 -

