

442610

Int.	C07G; B01D

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

por "UN PROCEDIMIENTO PARA AISLAR PROTEINAS CITOPLASMICAS"  
a favor de la firma suiza SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.  
residente en VEVEY (Suiza).

= .. =

MEMORIA DESCRIPTIVA

El presente invento se refiere al aislamiento de  
proteinas.

Las proteinas vegetales pueden obtenerse de dos  
tipos de fuentes, que son las semillas y las hojas de diver-  
sas plantas que contienen proteinas. Si bien las proteinas  
de semillas, como, por ejemplo, las proteinas de soja y de  
cacahuete, han encontrado amplias aplicaciones en la indus-  
tria alimenticia, las proteinas de hojas, que existen en  
asociación con pigmentos verdes (clorofilas); no se utilizan  
en ninguna extensión importante, precisamente debido a su

color. Aún cuando existen diversos métodos para extraer proteínas decoloradas de las hojas, ninguno de éstos resulta totalmente satisfactorio para aplicarse en operaciones industriales.

5. Ahora se ha descubierto que las proteínas citoplásmicas sustancialmente decoloradas pueden aislarse de varios materiales de proteínas vegetales acuosos siguiendo un procedimiento particularmente sencillo que implica la floculación selectiva de proteínas pigmentadas o cloroplásticas mientras que quedan en solución las proteínas citoplásmicas deseadas.

10. Así pues, el presente invento proporciona un procedimiento para aislar proteínas citoplásmicas a partir de materias vegetales acuosas que contienen proteínas cloroplásticas y citoplásmicas el cual comprende adicionar chitosan al material vegetal para formar un floculado de proteínas cloroplásticas y un sobrenadante, separar el floculado y recuperar del sobrenadante una fracción que contiene proteínas citoplásmicas.

15. El chitosan es la poli-beta-(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-desoxi-D-glucosa de la fórmula  $(C_6H_{11}NO_4)_n$ , en donde n es un número entero superior a 1.

20. El material de partida vegetal del procedimiento es convenientemente un líquido o jugo acuoso obtenido de una fuente de proteínas de hoja, no limitándose el término "hoja" a las actuales hojas de una planta, sino que incluye otras partes (tallos, etc.) que contienen proteínas cloroplásticas y citoplásmicas, pero excluyendo las semillas. Ejemplos típicos de fuentes de proteínas de hoja son la alfalfa (mielga),

25.

remolacha y espinacas. Otras fuentes de proteínas de hoja incluyen Atriplex hortensis, Amaranthus caudatus, Chenopodium quinoa, Urtica dioica, Brassica napus, Brassica oleracea, Dalryllia glomerata, Helianthus annuus y Vigna sinensis. El

5. juego o suspensión puede contener, normalmente, del 2,5 al 10% en peso de materia seca que, a su vez, tiene, usualmente, un contenido de proteínas brutas del 25 al 50% en peso.

- El quitosan, que es sustancialmente insoluble en agua, puede adicionarse al material proteínico acuoso en forma de solución en un ácido diluido. Son apropiados diversos ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos, incluyendo el ácido acético y el clorhídrico. Debido a que la proteína recuperada está destinada, normalmente, al consumo humano, se prefiere, en particular, el ácido acético. La solución ácida
15. contendrá, generalmente, de 20 a 40 g de quitosan por litro; el pH de la solución está comprendido, de preferencia, entre 5,0 y 5,5, de modo que la floculación pueda tener lugar a un pH de 5,0 a 6,0. Según sea la concentración de proteínas del material vegetal acuoso es satisfactoria una adición de quitosan correspondiente a una cantidad comprendida entre 0,02 y
  20. 0,15 g por gramo de proteína bruta total. Por conveniencia, la cantidad de quitosan adicionada se expresa en gramos de quitosan por litro de material proteínico. Debido a que el quitosan se adiciona, de preferencia, en solución ácida, se
  25. modificará el pH natural del material vegetal acuoso, que normalmente está comprendido entre 5,7 y 6,1. Se ha observado una relación entre la cantidad del total de proteína (citolásmica y cloroplástica) recuperada y el pH del material proteínico después de la adición del quitosan, y también una

- relación entre el pH y la cantidad de la fracción citoplásmica recuperable del sobrenadante. Así pues, mientras que aumenta el total de proteína flocculable con la disminución del pH, la cantidad de proteína citoplásmica disminuye con la disminución del pH. Por consiguiente, para obtener un equilibrio razonable entre los rendimientos de las dos fracciones proteínicas, el pH del material proteínico, después de la adición de quitosan, está comprendido, de preferencia, entre 5,3 y 6,5, y deseablemente alrededor de 6,0.
- 5.
10. La flocculación de la proteína cloroplástica puede llevarse a cabo a temperaturas inferiores a alrededor de 40°, por ejemplo, a 10-20°C, de preferencia con vigorosa agitación durante la adición de quitosan, seguido de un período de sedimentación. El clofulado se separa, mas convenientemente, mediante centrifugación, pero pueden preverse también otros métodos físicos de separación como filtración y decantación.
15. La proteína cloroplástica separada es particularmente apropiada para incorporarse a piensos animales. El quitosan puede recuperarse suspendiendo la fracción cloroplástica en un medio acuoso a pH de 4 a 5. Con la centrifugación de la suspensión el quitosan queda en solución en el sobrenadante y puede precipitarse ajustando el pH a un valor superior a 7.
- 20.

- El sobrenadante obtenido después de la separación de la proteína cloroplástica flocculada puede tratarse de formas diferentes para recuperar la proteína citoplásmica soluble. Un procedimiento particularmente preferido implica el calentamiento del sobrenadante para producir la coagulación de la proteína, que puede recuperarse luego siguiendo los métodos físicos usuales. Resulta particularmente satisfactorio el calen-
- 25.

tamiento hasta unos 80°C durante alrededor de 2 minutos. Las proteínas citoplásmicas que no se han desnaturalizado con el calor pueden recuperarse convenientemente del sobrenadante. Alternativamente, la proteína disuelta puede precipitarse ajustando el pH hasta un valor de 4,0, aproximadamente. La proteína citoplásmica recuperada puede lavarse y secarse, lo que da un polvo con una coloración amarillenta muy pálida. Es apropiada para incorporarse a diversos alimentos y bebidas.

10. Los ejemplos que siguen se ofrecen únicamente con el fin de ilustrar el invento. Los porcentajes se expresan en peso.

EJEMPLO 1.

Se obtiene un jugo verde triturando y prensando una mezcla de alfalfa (84%) y ballíco (16%), que tiene un pH natural de 6,0 y que contiene materia seca al 4,5%. A un litro de este jugo se adicionan lentamente, a la temperatura del ambiente y con vigorosa agitación 67 cc/l de una solución al 3% de quitosan en ácido acético con un pH de 5,0.

20. Se forma inmediatamente un floculado y cuando se ha adicionado todo el quitosan el jugo tiene un pH de 5,5.

Se prosigue la agitación durante 5 minutos y luego se centrifuga la suspensión para separar las proteínas citoplásmicas floculadas. Se calienta el sobrenadante a 80°C durante 2 minutos y se recupera por centrifugación el precipitado resultante de proteínas citoplásmicas, se lava y se seca. De este modo se obtienen 90 gramos de un polvo sustancialmente incoloro que tiene un contenido proteínico de alrededor del 80%.

Resulta particularmente apropiado para incorporarse a alimentos.

EJEMPLO 2.

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 5. 1, con variaciones en la adición de quitosan y el pH, sobre partidas de jugo de alfalfa/ballico, conteniendo 5,0% de materia seca (Experimentos 2A-2D) y jugo directo de alfalfa conteniendo materia seca el 4,5% (Experimentos 2E-2K): Los resultados se resumen en la Tabla 1.

10.

TABLA 1

Exper. N°	Adición de quitosan g/l de jugo	pH del jugo después de la adición de quitosan	Rendimiento de fracción de proteína citoplásmica g/l de jugo
15. 2A	1,0	5,7	11,0
2B	2,2	5,5	9,2
2C	3,5	5,4	8,0
2D	7,0	5,3	6,8
2E	0,5	5,8	12,0
20. 2F	2,0	5,4	6,0
2G	2,2	5,2	10,0
2H	2,2	5,5	13,5
2I	2,2	5,7	16,5
2J	2,2	6,5	13,5
25. 2K	2,2	7,2	12,9

EJEMPLO 3.

Se repitió el procedimiento expuesto en el ejemplo 1 con jugo obtenido de espinacas frescas conteniendo 25 g de materia seca por litro. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2

Exper. N <sup>o</sup>	Adición de ohitosan g/l de ju- go	pH de jugo después de la adición de ohitosan	Rendimiento de fracción de proteína cito- plásmica g/l de jugo
5. 3A	0,5	5,6	3,2
3B	1,5	5,3	1,1
3C	3,5	5,2	1,2
10. 3D	4,5	5,1	2,0

= . =

REIVINDICACIONES

15. Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patente inglesa n<sup>o</sup> 49494 del 15-11-74.

20. 1.- Un procedimiento para aislar proteínas citoplásmicas, esencialmente de materiales vegetales acuosos que contienen proteínas cloroplásticas y citoplásmicas, caracterizado porque comprende adicionar ohitosan al material vegetal para formar un floculado de las proteínas cloroplásticas y un sobrenadante, separar el floculado y recuperar del sobrenadante una fracción que contiene proteínas citoplásticas.

25. 2.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el floculado se forma a un pH de 5,3 a 6,5.

3.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el floculado se forma a un pH de alrededor de 6,0.

4.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el floculado se forma a una temperatura inferior a unos 40°C.

5. 5.- Un procedimiento, de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el floculado se forma a una temperatura de 10 a 28°C.

10. 6.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la cantidad de quitosan adicionada está comprendida entre 0,02 y 0,15 gramos por gramo de la proteína bruta presente en el material vegetal.

7.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el quitosan se adiciona en una solución acídica.

15. 8.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque las proteínas citoplásmicas se recuperan del sobrenadante mediante coagulación por calor.

20. 9.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las proteínas citoplásmicas se recuperan del sobrenadante mediante precipitación a un pH de alrededor de 4,0.

25. 10.- Un procedimiento, de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque las proteínas citoplásmicas se recuperan del sobrenadante mediante ultrafiltración.

11.- Un procedimiento para aislar proteínas citoplásmicas.

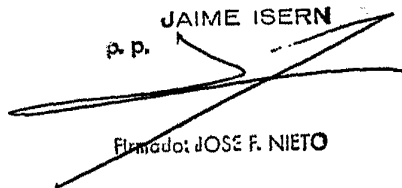
Según se describe y reivindica en la presente memoria

descriptiva que consta de 9 páginas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, a 14 NOV. 1975

P. a.

JAIME ISERN  
p. p.  
Firmado: JOSE F. NIETO

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'JAIME ISERN', is written over the typed name. The signature is somewhat stylized and overlaps with the typed text.

mpc.