



ESPAÑA

10 ES	11	NUMERO	A1
	21	462.813	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		30-9-77	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
262.397	30 de septiembre de 1976	CANADA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A235	

64 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UN PRODUCTO PROTEINICO.

71 SOLICITANTE (ES)
GENERAL FOODS, LIMITED.

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
2200 Yonge Street, Toronto, Ontario M5W 1J6, Canadá.

72 INVENTOR (ES)
Edward Donald Murray, Chester Donald Myers y Larry Donald Barker.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
GOMEZ-ACEBO.

La carencia universal cada vez mayor de alimentos, fertilizantes y energía y el aumento de la población mundial han hecho que la raza humana se preocupe de tratar de encontrar nuevas fuentes mejoradas y mayores de alimentos. La necesidad de proteínas en la dieta humana es un hecho lógico perfectamente establecido. Los esfuerzos realizados para aumentar el contenido proteínico de los alimentos y también, en algunos casos, hacer disponible la proteína contenida en diversas fuentes alimentarias hasta ahora sin investigar han tomado nuevas dimensiones en los últimos años. El resultado de estos esfuerzos han dado por fruto notables avances en áreas tales como por ejemplo, nuevas clases y variedades mejoradas de cosechas, proteínas unicelulares de hidrocarburos, sucedáneos de carne procedentes de fuentes proteínicas vegetales y similares. Es evidente que las plantas tienen que ofrecer y proporcionar una fuente abundante de proteínas; la dependencia de las proteínas procedentes de la carne, aves y pescados es limitada debido a que las zonas de pastos son cada vez más insuficientes y que las fuentes alimentarias para las aves son también cada vez más deficientes y también se agotan las zonas de pesca.

Por lo tanto, es conveniente desarrollar y proporcionar una nueva tecnología para la obtención de proteínas. Este invento se refiere a dicho proceso; de un modo más específico, comprende la preparación de aislados proteínicos por un procedimiento comparativamente suave que creemos no se ha descubierto hasta ahora. Dichos aislados proteínicos se pueden utilizar entonces, como tales o añadirse a alimentos formulados para aumentar el contenido proteínico total del alimento. En general, las proteínas en los alimentos tienen dos finalida

des principales. En primer lugar, casi todas las proteínas actúan para elevar la cualidad de nutrición general del producto al que se añaden. En segundo lugar, ciertas proteínas tienen una capacidad funcional, v.g., quedan comprendidas en la arquitectura molecular general del producto para producir un efecto microestructural específico. El costo total de la proteína particular se suele basar en su contribución combinada de nutrición y funcional a un producto acabado, v.g., se pagan precios extras por una mayor concentración de nutrición y funcionalidad.

Las proteínas industriales altamente elaboradas se suelen llamar aislados y como tales tienen contenidos proteínicos de por lo menos el 90 % (Nitrógeno Kjeldahl x 6,25) expresado sobre una base exenta de humedad. El término aislado se reserva normalmente a las proteínas de las plantas; no obstante, en el más amplio sentido de la definición podrían llamarse también aislados las proteínas de origen animal como la albúmina del huevo, cafeinato sódico y gelatina. Estos productos proteínicos animales altamente funcionales exigen un coste extra mayor que los aislados proteínicos de plantas porque estos últimos no se han desarrollado todavía con propiedades de nutrición y funcionales comparables a los primeros. No obstante, con métodos eficaces para la conversión de proteínas de las plantas a formas animales y las demandas de una población mundial cada vez en aumento en busca de proteínas animales, tiene que llegar la tecnología que reduzca las presiones de demanda de proteínas animales.

Aunque la literatura se refiere a muchas proteínas de las plantas procedentes de cereales amiláceos (trigo, maíz, avena, centeno, cebada, etc.), legumbres amiláceas (guisantes,

garbanzos, alubias blancas, alubias pintas, etc.) y semillas oleosas (semilla de girasol, semilla de nabo silvestre, habas de soja, cacahuetes, etc.), en general, el aislado proteínico vegetal principal a escala comercial procede de la soja. Un procedimiento para preparar aislado proteínico de soja fué descrito en 1957 en la patente Estadounidense Nº 2.765.155 por Anson y Fader quienes obtenían una solubilización alcalina (tratamiento con pH elevado) de las proteínas en la harina de soja, extraían entonces el material insoluble por centrifugación y añadían ácido clorhídrico al sobrenadante que contenía las proteínas solubilizadas alcalinas. Con esta operación se precipitaban las proteínas isoelectricamente produciendo por lo tanto un producto altamente proteínico, V.G., un aislado proteínico. La precipitación isoelectrica de las proteínas de la soja ha demostrado ser un método económico y práctico a escala industrial que se ha constituido en la forma técnica dominante para la preparación de aislados proteínicos en las últimas dos décadas.

Sair (1959) describía en la patente Estadounidense Nº 2.881.076 un aislado mejorado de soja de gran rendimiento, aunque el procedimiento utilizaba todavía una fase de precipitación isoelectrica. Kraskin (1972 en la patente Canadiense Nº 915.105 describía un método mejorado para extratar materias proteínicas empleando enzimas además de manipulación con pH alcalino para solubilizar cantidades máximas de proteínas; una vez que se conseguía, la precipitación de las proteínas se realizaba isoelectricamente. Otro procedimiento mejorado, empleado una temperatura ligeramente elevada y manipulación del pH para conseguir una elevada solubilidad de las proteínas fué descrito por Calvert et al (1973) en la patente Canadiense Nº

917.995; la proteína se precipitaba entonces isoeléctricamente para dar un producto homogéneo, blando y blanco. Boyer (1973) en la patente Canadiense Nº 935.024 describía una cuajada a modo de queso de proteína de soja que preparaba a partir de proteína precipitada isoeléctricamente, una fase de calor antes de la precipitación daba lugar a una cuajada blanda. Hawley (1973) en la patente Canadiense Nº 936.408 empleaba una combinación de tratamiento térmico y enzimático para producir un preparado proteínico especial para bebidas ácidas y para productos de horno; una vez más las proteínas tratadas de un modo especial se precipitaban isoeléctricamente.

Empleando materias primas distintas a la soja y desviándose de la tecnología de la soja, Wagner (1973) en la patente Canadiense Nº 920.869, describía un procedimiento para recuperar proteínas de las legumbres por precipitación isoeléctrica; el olor del producto final mejoraba por una fase de calor antes de la solubilización alcalina y precipitación ácida. Un procedimiento para recuperar una proteína de semilla de nabo silvestre desprovista de tóxico fué descrito por Owen (1973) en la patente Estadounidense Nº 3.758.452 por el cual una torta de prensa se solubilizaba con cloruro sódico, v.g., una fase de solubilización salina en lugar de la solubilización alcalina empleada más comúnmente a escala industrial. Después de haberse separado la materia particulada, la proteína soluble en sal se precipitaba isoeléctricamente por adición de ácido. En otro ejemplo de este tipo de tecnología, Flink y Christiansen (1973) *The Production of a Protein Isolate From Vicia faba*, *Lebens - Wiss u Technol* 6: 102 - 106, describen la preparación de un aislado proteínico de alubias (Vicia faba) por solubilización de la proteína a un pH de 8 a 10 y después

precipitación isoeléctrica de la proteína.

Aunque los ejemplos anteriores representan tan solo algunos de los procedimientos para preparar los aislados proteínicos, es evidente que cada uno comprende una fase de precipitación isoeléctrica de proteínas solubilizadas. En la mayoría de los casos, las proteínas se solubilizan por extracción alcalina, mejorándose el tratamiento en algunos casos con una mayor temperatura, actividad enzimática y/o adición de sal. No obstante, cualquiera que sea el esquema de la solubilización, siempre se emplea ácido para la precipitación isoeléctrica del producto deseado. Además, se observará que para conseguir un nivel razonable de proteínas solubilizadas (y por lo tanto un procedimiento eficaz) se exige normalmente una fase de pH alcalino.

La elaboración química de alimentos y las modificaciones resultantes de dicha elaboración son asuntos de interés en aumento por parte de consumidores, fabricantes y autoridades. Con frecuencia un nuevo procedimiento parecerá ser un notable avance en la tecnología actual, pero al tener conocimiento de los efectos de dicho procedimiento sobre los alimentos y química de los cuerpos se generan algunas reservas respecto al empleo del producto. Tal parece ser el caso de los aislados proteínicos preparados por solubilización alcalina y precipitación con ácido. En 1969, deGroot y Slump, *Effects of Severe Alkali Treatment of Proteins on Amino Acid Composition and Nutritive Value, Journal of Nutrition*, 98: 45 - 56, informan que el aislado de proteína de soja tratado con alcali contenía el derivado aminoácido lisinoalanina (LAL) que es absorbido deficientemente en el intestino de los animales. Además, existía una correlación negativa entre el nivel

de LAL en la dieta y los valores netos de utilización de la proteína (N.P.U.). Después, Woodard y Short (1973), Toxicity of Alkali - Treated Soy Protein in Rats, Journal of Nutrition 103 : 569 - 574, confirmaban la presencia de LAL en proteína

5 de soja tratada con alcali y mostraban una aparente correlación entre el nivel de LAL y las reacciones nefrotóxicas en las ratas. La reducción común en la relación de eficacia proteínica (P.E.R.) de los aislados de soja, cuando se compara con la harina de soja y el concentrado, se debe probablemente

10 a la formación de LAL en la elaboración alcalina/ácida y, por lo tanto, la reducción de la lixina de aminoácido esencial. Una aparición más general de LAL fué observada por Sternberg et al (1975) lixinoalanina: Presence in Foods and Ingredients, Science, 190: 992 - 994, quien halló elevados niveles de LAL

15 en ciertas muestras de caseinato sódico, sólidos desecados de clara de huevo, y diversos alimentos elaborados; además, observaron la presencia de LAL en alimentos calentados en condiciones no alcalinas. Otro punto de interés relativo al LAL en productos alimenticios ha sido propuesto por Groos (1975),

20 The Chemistry and Biology of Amino Acids in Foods Proteins, Agrochemistry Abstract N° 32, Primer congreso Químico del Continente Norte Americano, Ciudad de México, quien mostró que el LAL puede producir la reabsorción de un feto en desarrollo en el útero de las ratas y los conejos. Los métodos para preparar aislados proteínicos sin tratamientos alcalinos térmicos

25 ayudarían a reducir este derivado de aminoácido cuestionable en los alimentos.

Este invento se refiere a un nuevo procedimiento para la preparación de aislados proteínicos a partir de una amplia variedad de fuentes. Este procedimiento no emplea extre

30

mos de álcali, ácido ni calor, sino que explota el principio perfectamente conocido de aumentar la solubilidad de cantidades de proteína con sales comunes de calidad alimentaria a un nivel de pH casi neutro. El procedimiento consiste en general no solamente en la solubilización de las proteínas sino también, y especialmente en el método de precipitación de proteínas solubilizadas con sal, porque se ha descubierto que cuando la potencia iónica de un sistema proteínico solubilizado con sal, se reduce, se produce una precipitación masiva de la proteína permaneciendo la mayor parte de la sal en fase acuosa.

Esta inversión del proceso de solubilización que da por resultado entonces la precipitación de la proteína, puede tener lugar en muchas combinaciones de temperatura y pH. No obstante, cualquier combinación particular de temperatura de pH determinará el nivel de sal necesario para una solubilización óptima y también el grado de reducción de nivel salino para una precipitación óptima. La forma del precipitado puede variar considerablemente en diferentes combinaciones de pH y temperatura. El fenómeno al que nos referimos en el presente invento y en esta memoria descriptiva, comprende una sección particular del espectro de diferentes formas de precipitados y, por lo tanto, restringe la combinación de pH - temperatura y, por consiguiente, el nivel salino que se puede emplear en el proceso de elaboración.

El fenómeno mencionado se puede considerar similar al encontrado en la solución acuosa de un detergente anfifílico donde una concentración de anfifila en exceso a un valor particular característico de la anfifila, hace que las anfifilas reaccionen entre sí y se asocien en agregados termodinámicamente estables conocidos como coloides micelares. Las carac-

terísticas distintivas de estos coloides micelares son: (1) que las fuerzas repulsivas electrostáticas en los extremos polares de las anfifilas restringen el desarrollo (y, por lo tanto, el tamaño) de los coloides micelares; (2) que la propiedad hidrófoba de los extremos no polares de las anfifilas promueve el desarrollo de los coloides micelares y (3) que la superficie del coloide micelar adopta una forma que reduce al mínimo la energía de reacción del área superficial del coloide micelar con el medio ambiente del coloide (exponiéndolo en términos generales, la forma adoptada reduce al mínimo el área superficial del coloide micelar para cualquier número particular de anfifilas individuales contenidas en el mismo).

La invención del proceso de solubilización se manipula entonces de tal manera que las proteínas se ven obligadas a responder a su medio ambiente como cabría esperar que respondiera una anfifila. Esto comprende, entonces, la explotación del carácter hidrófobo de las proteínas para mejorar la formación de aglomerados que se desarrollan a un tamaño suficiente para evitar la suspensión en su ambiente acuoso y, por lo tanto, se produce la precipitación. Según el presente invento, se ha descubierto que si la propiedad hidrófoba de la proteína no se explota apropiadamente, el precipitado, formado por inversión de la solvación de la proteína, no se encuentra en la forma única deseada; el precipitado será amorfo sin tener tamaño ni forma de partícula uniformes; las características físicas de este precipitado no específico no se adaptarían a la descripción que podría darse de un aislado proteínico preparado por el procedimiento del invento. A pesar de que dichos precipitados no específicos pueden comprender todavía interacciones hidrófobas, estos precipitados no específicos no se in-

cluyen en el proceso de este invento. El fenómeno descrito en la presente memoria se puede denominar como "Hidrofobización" (al contrario que el fenómeno comúnmente más conocido de solubilización) y comprende tan solo las condiciones que dan lugar a la precipitación de la proteína en la forma única descrita en la presente Memoria.

Las proteínas empleadas en este nuevo procedimiento pueden proceder de una amplia variedad de fuentes, puesto que todos los sistemas biológicos, sean animales, vegetales o microbianos, sintetizan proteínas para diversas funciones metabólicas estructurales. Es interesante observar que, a medida que aparecen disponibles los detalles moleculares de estas proteínas es cada vez más evidente que muchas (sin tener en cuenta su fuente de origen) son proteínas globulares donde la cadena de polipéptidos se amolda perfectamente a una forma compacta esférica o globular. Además, la biología molecular moderna ha establecido que existe una tendencia general a que los residuos de aminoácidos polares en las proteínas globulares se concentren sobre la superficie de la estructura mientras que los aminoácidos apolares (hidrófobos) se encierran en el interior de la molécula, permitiendo de este modo que estos residuos de aminoácidos eviten el medio ambiente acuoso que predomina en el interior de las estructuras celulares. Un análisis de las proteínas globulares (Bigelow 1967), On the Average Hydrophobicity of Proteins and the Relation Between it and Protein Structure, Journal of Theoretical Biology, 16: 187 - 211, ha demostrado que muchas de estas proteínas no tienen residuos polares suficientes para cubrir o enmascarar el núcleo hidrófobo; por consiguiente, la superficie de estas moléculas proteínicas adoptan un carácter ambivalente, v.g., po

seen el potencial para tener propiedades superficiales polares (cargadas o cargables) y apolares (hidrófobas). En la química de las proteínas, la presencia de estas propiedades se manifiesta en diferentes modos, dependiendo del medio ambiente dado en el cual se sitúe la proteína particular. Las proteínas con elevados valores hidrófobos (v.g., superiores a 950 - 1000 calorías /residuo, calculado por el método de Bigelow) cabe esperar que puedan poseer las características ambivalentes o anfifílicas. Son precisamente estas proteínas las que pueden experimentar reacciones de asociación entre proteínas para formar estructuras de elevado peso molecular. Además, la expresión de efectos polares dependerá en grado notable de la presencia de grupos ionizables o ionizables en potencia. Los datos comparativos sobre hidrofobicidades y potenciales de carga de algunas proteínas comunes han sido expuestos por Bigelow. Parece ser que si se mejoraran o manipularan los efectos hidrófobos se reducirían al mínimo los efectos de la carga.

La primera etapa en la utilización general del procedimiento de novedad descrito en la presente memoria es solubilizar cantidades máximas de las proteínas globulares deseadas. Para conseguirlo, la materia prima se debe descomponer físicamente y reducirse o molerse a un tamaño de partícula muy pequeño de modo que se exponga a la solución solubilizante una gran área superficial. En la práctica, esta fase exige normalmente disrupción de las células y quizá la eliminación física de cierta materia no proteínica por técnicas suaves a temperatura ambiente (v.g., tamizado, molido, clasificación por aire, etc). La fracción proteínica (normalmente una harina seca o concentrado) se mezcla entonces en una solución que contiene tan solo agua y una sal apropiada de grado alimenticio

(cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, etc.) durante un tiempo suficiente para solubilizar las proteínas deseadas. Después de agitar el sistema de proteína/sal/agua durante un tiempo apropiado (normalmente de 10 a 60 minutos) a temperatura moderada (normalmente de 15 a 35°C), la materia
5 particulada insoluble (normalmente detritus celular y quizá gránulos de almidón) se separa de las proteínas solubilizadas por sedimentación, filtración, tamizado, decantación o centrifugación. En la práctica, esta fase es la preferible. Aunque
10 la concentración salina es del orden de 0,2 a 0,8 de potencia iónica (μ), el nivel real de la sal empleada se elige experimentalmente determinando la concentración de sal mínima necesaria para obtener niveles máximos de proteína solubilizada. En la práctica, esto varía con la proteína particular, el nivel
15 de sales en la materia fuente, el tamaño de partícula de la materia, la sal específica empleada más la temperatura en tiempo de extracción. El extracto resultante, que contiene muchos compuestos solubilizados además de las proteínas, se denomina extracto proteínico de elevado contenido salino y es
20 un resultado del fenómeno de solubilización perfectamente conocido. Desde un punto ideal, este extracto deberá tener una concentración proteínica de por lo menos 15-20 mg/cc (1,5-2,0% peso/volumen) y puede alcanzar de 5 a 100 mg/cc (7,5 - 10 % peso/volumen). El extracto ha de tener preferiblemente un pH
25 de aproximadamente $6,00 \pm 0,50$ que es frecuentemente el pH natural del sistema de proteína/sal/agua no obstante, si el pH de desplazara de esta gama durante la solubilización de la proteína debido a la reacción de la materia prima con la sal de extracción o el agua, se pone de nuevo dentro de esta gama neutralizando el efecto con ácido o base de grado alimenticio. No
30

se deja que el extracto esté en un ambiente de pH fuera de esta gama y se evitan concentraciones localizadas de ácido o base por agitación rápida.

5 La segunda fase en la preparación del nuevo aislado proteínico es reducir simplemente la potencia iónica de este medio expuesto a la proteína solubilizada. Se puede realizar por diversos métodos que comprenden técnicas de separación por membrana (v.g., diálisis), o simplemente por dilución del extracto proteínico de elevado contenido salino en agua. En la

10 práctica, se emplea en general esta última etapa. El resultado de esta reducción de potencia iónica es nuevo porque a medida que se reduce el efecto de solubilización las estructuras proteínicas aglomeradas (formadas por la fase de solubilización) se ven obligadas a pasar por una serie de reacciones de

15 dosificación para ajustarse al nuevo ambiente de bajo contenido salino. Esto produce una rápida reducción en el peso molecular de los aglomerados proteínicos muy sueltos formados durante la solubilización y la generación de una preponderancia de especies de peso molecular comparativamente bajo. Esta acumulación de proteínas globulares anfifílicas se puede enlazar

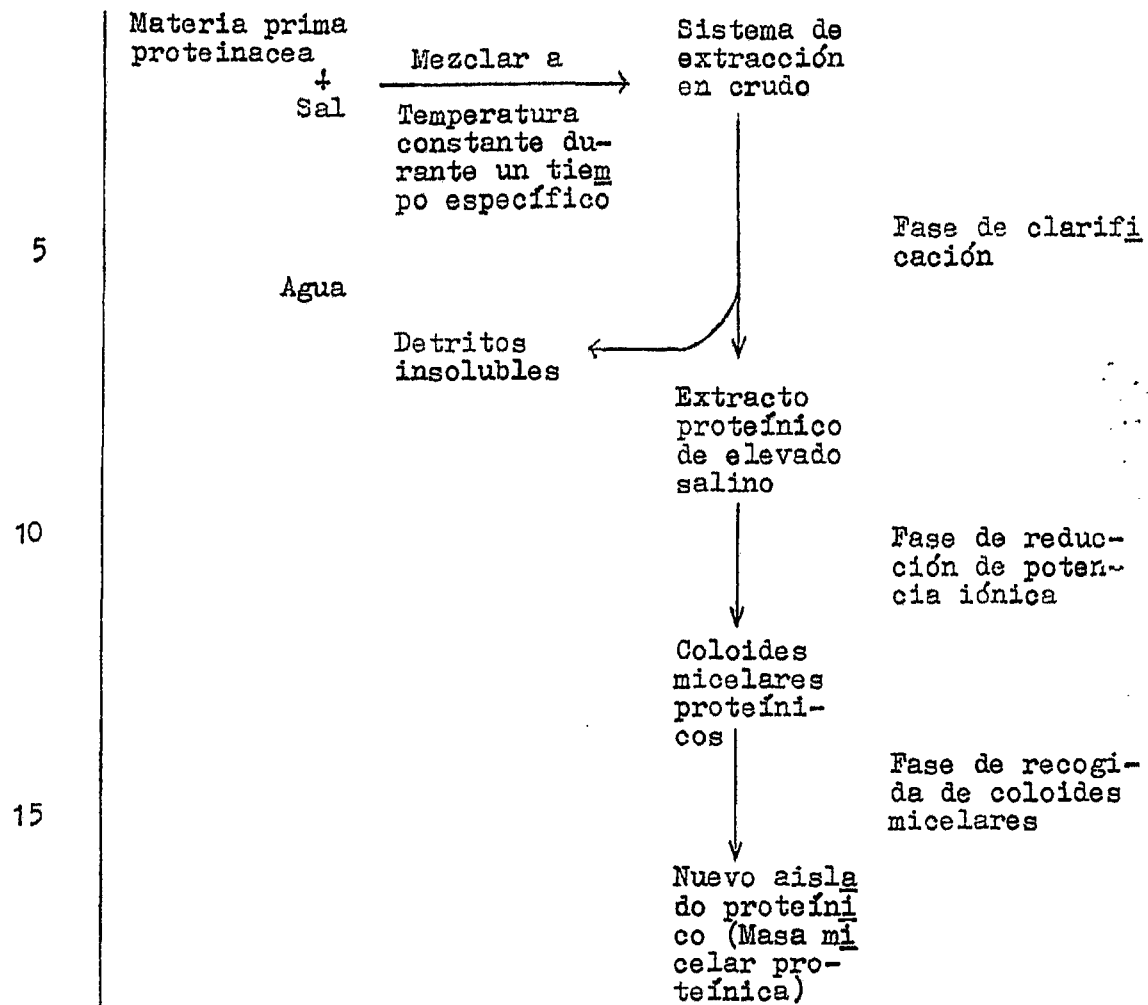
20 a la formación de una C.M.C. (concentración crítica de coloides micelares) que se encuentra en sistemas detergentes y cuando se consigue esta C.P.C. (concentración de proteína crítica), las proteínas buscan una disposición termodinámicamente estable por la cual las partes polares sobre las superficies de la

25 proteína quedan expuestas al agua y las partes hidrófobas se arraciman en un intento de evitar el agua. Esta disposición estable se manifiesta como pequeñas esferas microscópicas que contienen muchas moléculas proteínicas globulares asociadas.

30 Estas esferas varían de tamaño pero se pueden observar fácil-

mente con un microscopio ordinario y se han llamado "coloides micelares proteínicos". En adelante, se empleará el término coloide micelar en ocasiones en la descripción para referirnos a esta nueva forma de proteína. En la figura se representa una exposición del esquema de producción de coloides micelares proteínicos general. Aunque ya se conocen coloides micelares de otros tipos y se han descrito en otras tecnologías, los coloides micelares proteínicos que se han descubierto y que se producen por el procedimiento del presente invento son fácilmente distinguibles de los citados. Así, a pesar de que se conocen coloides micelares lípidos, existe aparentemente una limitación en el grado de desarrollo de dichos coloides micelares lípidos o en su capacidad de asociación por interacción, debido a cargas electrostáticas repulsivas que se oponen a la energía atractiva hidrófoba de estas especies. Además, a pesar de que los coloides micelares proteínicos se forman de un modo natural por las caseínas de la leche, dichas estructuras dependen notablemente de las fuerzas iónicas específicas. Aunque la teoría completa en la que se basa el presente invento no se comprende plenamente, el procedimiento del invento no ofrece una funcionalidad en fuentes proteínicas para hacer que las proteínas globulares, que se recuperan en forma de coloides micelares, reaccionen entre sí y tenga utilidad por lo tanto en aplicaciones tradicionales y no tradicionales para las proteínas particulares en cuestión.

Figura 1 - Ilustra el procedimiento esquemático general para la producción de aislados proteínicos por la técnica de los coloides micelares. En los ejemplos se exponen detalles específicos de las diversas fases de elaboración.



20 Las fuertes interacciones entre proteína durante la formación de los coloides micelares excluyen aparentemente gran parte de la materia no proteinacea. De este modo, se firman aislados altamente proteínicos y se deben emplear factores de conversión de Kjeldahl bajos pero realistas en los

25 ejemplos citados. Los coloides micelares proteínicos asociados se recuperan empleando técnicas de sedimentación y/o centrifugación que dan por resultado una materia a modo de gluten, gelatinosa y muy viscosa que se denomina P.M.M. (masa micelar proteínica). Esta materia P.M.M./ se puede emplear en forma

30 húmeda (aproximadamente 70 % de humedad) o se puede desecar

por técnicas normales, siendo el método normal de elección la deshidratación por aspersión a temperaturas mínimas.

Los aislados proteínicos resultantes (P.M.M.) se pueden emplear para la fortificación proteínica de productos alimenticios elaborados, emulsión de aceites, adición a productos alimenticios preparados al horno para darlos cuerpo, agentes espumantes en productos que ocluyen aire, etc. No obstante, además de estas aplicaciones, el nuevo aislado proteínico preparado por el procedimiento de los coloides micelares posee nuevos tipos de funcionalidad que no se conocían anteriormente como característicos de algunas de las fuentes de proteínas empleadas en el procedimiento de este invento. Por ejemplo, el nuevo aislado se puede dar forma de fibras proteínicas (que tienen utilidad en sucedáneos de carne) por inyección a través de una hilera del aislado húmedo (P.M.M.) en agua corriente caliente. Asimismo, el aislado (en forma húmeda o seca) actúa como aglutinante de componentes alimenticios similar al albúmina del huevo. Este tipo de aislado especial tiene una elevada capacidad de dispersión en bebidas ácidas, puede reemplazar o prolongar el gluten del trigo en la elaboración de productos a base de trigo (pan, bollos y pastas).

Otra aplicación del nuevo aislado proteínico, v.g., la masa micelar proteínica precipitada, es que se puede emplear como materia prima apropiada en la tecnología de mesofase descrita en 1972 por Tombs (Patente Canadiense 917.495). En este caso, cuando se añaden niveles elevados de sal (por lo menos 0,2 M) al P.M.M. húmedo, las proteínas en el P.M.M. se solubilizan y se produce una mesofase traslúcida que posee las propiedades de las mesofases de elevado contenido salino reivir

dicadas por Tombs.

Para ilustrar el presente invento de un modo adicional, pero sin limitación se exponen los ejemplos que siguen:

EJEMPLO 1

5 Se molieron alubias (Vicia faba L. var minora) a un tamaño fino de partícula y después se clasificó por aire para producir un concentrado de 53 % de proteína (N x 5,85). Las proteínas de esta legumbre amilacea se extractaron con una solución de cloruro sódico acuoso a 37°C. El concentrado seco se mezcló con una solución de cloruro sódico 0,3 M (potencia iónica 0,3 μ) a un nivel del 10 % peso/volumen, v.g., una parte de concentrado por 10 partes de solución salina.

10 La mezcla se agitó por espacio de 30 minutos, sin necesidad de ajustar el pH, para mantener el extracto a un pH de 5,90 \pm 0,20. El sistema se elaboró para eliminar los detrituos celulares y los gránulos de almidón por centrifugación empleando un aparato desenlodador continuo. El extracto proteínico resultante de elevado contenido salino (v.g., el sobrenadante) contenía más del 80 % de la proteína total de la semilla originalmente en el concentrado clasificado por aire y tenía una concentración proteínica de aproximadamente 45 mg/cc. Este extracto, que se hallaba todavía a 37°C, se diluyó en agua fría en una proporción de 1:3 (una parte de sobrenadante por tres partes de agua). Inmediatamente después de la dilución, se formó una nube blanca en el sistema de dilución. Debido a la potencia iónica rápidamente reducida, a la disociación de los aglomerados de elevado peso molecular (formados por subilización) siguió la reasociación en coloides micelares proteínicos a medida que se conseguía el C.P.C. de la unidad de formación del coloide micelar. Una comproba-

15

20

25

30

ción al microscopio de esta nube demostró la presencia de numerosas esferas de pequeño tamaño que se aglutinaban en una cepa específica de proteína (Ponceau 2R). El sistema de dilución se dejó reposar sin agitación por espacio de unos 30 minutos mientras que se precipitaban del mismo los coloides micelares proteínicos. El sobrenadante se decantó entonces y se encontró un precipitado gelatinoso viscoso en el fondo del recipiente. Este material que se había deshidratado por aspersion a 100°C de temperatura de salida poseía un contenido proteínico muy elevado (Tabla 1); es evidente que las interacciones entre proteínas durante la formación de los coloides micelares producen un aislado proteínico rico (P.M.M.) con muy poca materia contaminante. La biología molecular de la formación de coloides micelares proteínicos es algo compleja y no se comprende plenamente en los tiempos presentes.

TABLA 1 COMPOSICION DE UN NUEVO AISLADO DE ALUBIAS PRODUCIDO POR EL PROCESO MICELAR. LOS VALORES SE EXPRESAN EN UNA BASE DE PESO EN SECO, SE EMPLEARON OFICIALES DE A.O.A.C.

	<u>Concentrado</u>	<u>Aislado</u>
Proteína (Kjeldahl N x 5,85)	52,9 %	95,57 %
Fibra	1,0	N.D. *
Lípido	2,1	N.D. *
Ceniza	8,6	2,81
Fósforo	0,69 %	0,37 %
Otros y error experimental	34,71 %	1,25 %

* N.D.- No detectado por el método empleado.

El factor de conversión bajo de Kjeldahl empleado en este caso es apropiado para esta fuente de planta particular; el factor de conversión normal de comercio (6,25) no podría ta

ner aplicación. Los análisis de aminoácidos (realizados esencialmente según describe D.H. Spackman en *Methodo in Enzymology*, volumen 11, 1967) del concentrado proteínico de las alú-
 bias (materia prima) y el P.M.M. de secado por aspersión (el
 5 aislado así producido) demuestran que no existe una reducción importante en lixina debido al proceso general de P.M.M. y no podría observarse máximo de LAL en los aminogramos de la mate-
 ria prima o en el producto acabado (Tabla 2). La falta de
 10 cualquier álcali durante la elaboración de la proteína y el tiempo corto y baja temperatura necesarias para la deshidratación por aspersión producía un aislado proteínico desprovisto de LAL. También es digno de observación el que el nivel ge-
 neral de fósforo del aislado es de aproximadamente 46 % menor que el del concentrado, indicando que el fósforo no se liga
 15 al nuevo aislado en grado tan notable como al aislado de soja tradicional donde el fósforo se precipita con la proteína iso-
 eléctrica.

TABLA 2 NIVELES DE CIERTOS AMINOACIDOS EN EL CONCENTRADO Y AISLADO DE ALUBIAS PREPARADO POR EL PROCESO MICELAR, INDICADO EN MOLES POR 10⁵ G DE PROTEINA

	<u>Concentrado</u>	<u>Aislado</u>
Lisina	37	35
Cistina	6	6
Metionina	4	4
25 Triptofan	4	4
Histidina	18	19
Lisinoalanina	N.D. *	N.D. *

* N.D.- No se detectó por el método empleado.

EJEMPLO 2

30 Una harina de alúbias, preparada a partir de alúbias

5 molidas para dar un producto de 29,1 % proteina (N x 5,85), se
empleó de una manera similar al concentrado del ejemplo 1, ex-
cepto que se empleó un sistema de 25 peso/volumen (v.g., hari-
na en una solución de cloruro sódico 0,3 M). Se produjo un
extracto proteínico de elevado contenido salino de 47,0 mg/cc
que producía en dilución un nuevo aislado similar al descrito
en el ejemplo 1.

EJEMPLO 3

10 Otro ejemplo de la utilización de legumbres amilá-
ceas en la formación de un aislado proteínico por el proceso
micelar comprende el empleo de guisantes secos, que se limpian,
se muelen y se clasifican por aire para dar un concentrado pro-
teínico inicial del 52,6 % (N x 5,85). El concentrado seafia-
dió a una solución de cloruro sódico 0,4 N a un nivel del 10%
15 peso/volumen y se agitó por espacio de 30 minutos a 25°C. Se
preparó un extracto proteínico de elevado contenido salino por
centrifugación y después se diluyó en agua corriente fría a un
régimen de 1:5. Los coloides micelares proteínicos resultan-
tes se recogieron y deshidrataron por aspersion a temperatu-
20 ras de 100°C para obtener un aislado (Tabla 3). Los análisis
de aminoácidos (Tabla 4) no mostraban reducción alguna de li-
sina durante la formación del aislado y la ausencia de LAL en
el concentrado inicial y en el aislado final. Como en los
otros nuevos aislados, se redujo el nivel de fósforo, si se
25 compara con el concentrado inicial.

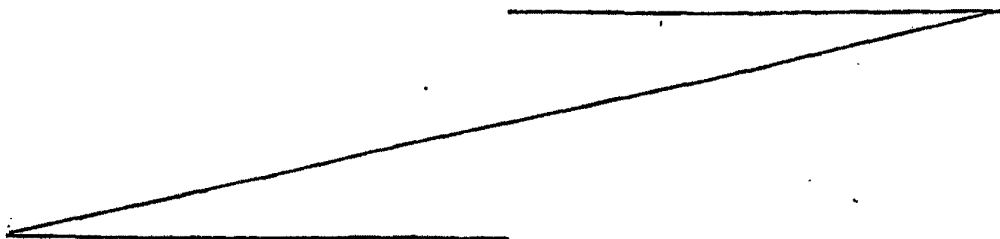


TABLA 3 COMPOSICION DEL NUEVO AISLADO DE GUISANTES PREPARADO POR EL PROCEDIMIENTO MICELAR. LOS VALORES SE EXPRESAN SOBRE UNA BASE DE PESO EN SECO, SE EMPLEARON METODOS OFICIALES DE A.O.A.C.

	<u>Concentrado</u>	<u>Aislado</u>
5 Proteina (Kjeldahl N x 5,85)	52,6 %	95,5 %
Fibra	1,95	N.D. x
Lípido	4,99	2,47
Fósforo	0,81	0,29
10 Otros y error experimental	37,20	1,74

x N.D.- No detectado por el método empleado.

TABLA 4 NIVELES DE CIERTOS AMINOACIDOS EN EL CONCENTRADO Y AISLADO DE GUISANTES PREPARADO POR EL PROCEDIMIENTO MICELAR, INDICADO EN MOLES POR 105 G PROTEINAS

	<u>Concentrado</u>	<u>Aislado</u>
15 Lisina	47	48
Cistina	5	5
Metionina	5	4
Triptofan	3	3
20 Histidina	20	21
Lisinoalanina	N.D. x	N.D. x

x N.D.- No se detectó por el método empleado.

EJEMPLO 4

Se preparó una harina que contenía 23,3 % de proteína (N x 6,25) moliendo alubias a un tamaño de partícula fino. Un sistema del 10 % peso/volumen de esta harina en una solución de cloruro sódico 0,4 M se agitó por espacio de 30 minutos a 37°C. Un extracto proteínico de elevado contenido salino producido después de la centrifugación, contenía 26,3 mg de proteína por cc de extracto; se diluyó en una relación de 1:3

en agua fría para formar coloides micelares proteínicos que formaban coalescencia para formar el nuevo aislado.

EJEMPLO 5

5 Una harina hecha a partir de garbanzos se extractó con cloruro sódico 0,5 M para dar un extracto proteínico de elevado contenido salino que contenía un nivel proteínico de 21,5 mg/cc. Después de la dilución (1:4) de este extracto en agua fría, se formaban coloides micelares proteínicos que formaban coalescencia para dar el aislado proteínico nuevo.

10 EJEMPLO 6

Un concentrado proteínico de alubias se extractó al nivel del 10 % peso/volumen y a 25°C con una solución de cloruro potásico 0,4 M. El extracto proteínico de elevado contenido salino tenía un pH final de 5,80 y un nivel proteínico solubilizado de 49,66 mg/cc. El extracto se diluyó en una relación de 1:5 en agua fría para formar coloides micelares proteínicos que se recogieron por centrifugación a 3.000 x g para formar el nuevo aislado proteínico.

15 EJEMPLO 7

20 El nuevo aislado se produjo a partir del concentrado proteínico de alubias como en el ejemplo 5, excepto que se empleó fosfato de dihidrogeno sódico 0,5 M en lugar del cloruro potásico.

EJEMPLO 8

25 Se añadió harina de semilla de nabo silvestre (aproximadamente 35 % de proteínas) a una solución de cloruro sódico 0,5 M a un nivel final del 10 % peso/volumen. El sistema se mezcló a 37°C por espacio de 30 minutos sin ajuste de pH y entonces se separó el material particulado por centrifugación (5.000 x g durante 10 minutos). El sobrenadante proteínico

30

resultante tenía un pH de 5,8 y una concentración de proteína de 16,6 mg/cc (1,66 % peso/volumen). El sobrenadante se diluyó con agua fría (aproximadamente 8°C) en una relación de aproximadamente 1:10, v.g., una parte de sobrenadante por 10 partes de agua. Esta dilución redujo la potencia iónica del medio ambiente proteínico y se formaron coloides micelares que se dejaron sedimentar para formar una masa micelar proteínica. v.g., el nuevo aislado de elevado contenido proteínico.

EJEMPLO 9

Se añadió una harina de girasol comercial (aproximadamente 42 % proteína) a una solución de NaCl 0,4 M (potencia iónica 0,4) a un nivel final de 10 % peso/volumen. Este sistema se mezcló a 37°C por espacio de 30 minutos sin ajuste del pH y el material particulado se separó por centrifugación (5.000 x g por espacio de 10 minutos). El extracto proteínico resultante de elevado contenido salino tenía un pH de 6,1 y una concentración proteínica de 19,2 mg/cc (1,92 %). El sobrenadante se diluyó en agua fría (aproximadamente 8°C) en una relación de aproximadamente 1:10, los coloides micelares que se formaban se recogieron para obtener el nuevo aislado proteínico que contenía 96,2 % de proteína (N x 4,85).

EJEMPLO 10

Se añadieron granos de soja (45 - 49 % proteína) a una solución de cloruro sódico 0,4 M a un nivel final del 15 % peso/volumen. El sistema se mezcló a 25°C por espacio de 30 minutos sin ajuste del pH y entonces el material particulado se separó por centrifugación (5.000 x g por espacio de 10 minutos). El sobrenadante proteínico resultante tenía un pH de 6,0 y una concentración proteínica de 19,0 mg/cc (1,9 % peso/volumen). El sobrenadante se diluyó con agua fría (aproximada-

mente 8°C) para reducir la potencia iónica del sistema y las proteínas reaccionaron para formar coloides micelares, que se observaron al microscopio. Cuando se recogieron los coloides micelares por sedimentación, se produjo un aislado gelatinoso viscoso que, en seco, contenía 90,0 % de proteínas (N x 5,85).

EJEMPLO 11

Se molió avena de elevado contenido proteínico para formar una harina de 17,8 % proteína (N x 5,83). Un sistema de harina al 20 % peso/volumen en cloruro cálcico 0,5 M se agitó a 37°C por espacio de 30 minutos, y los reactivos en este sistema hicieron que el pH de la extracción redujera el campo de formación de coloides micelares; por consiguiente, se añadieron pequeños volúmenes de hidróxido sódico para mantener el pH a 6,3. La materia particulada se separó por centrifugación y el extracto proteínico resultante de elevado contenido salino (que contenía proteína 25,4 mg/cc) se dializó contra agua fría que redujo la potencia iónica e hizo que se formaran coloides micelares proteínicos. Estos coloides recogieron como un P.M.M., v.g., nuevo aislado proteínico y, en seco, contenía 93,3 % de proteína (N x 5,83).

EJEMPLO 12

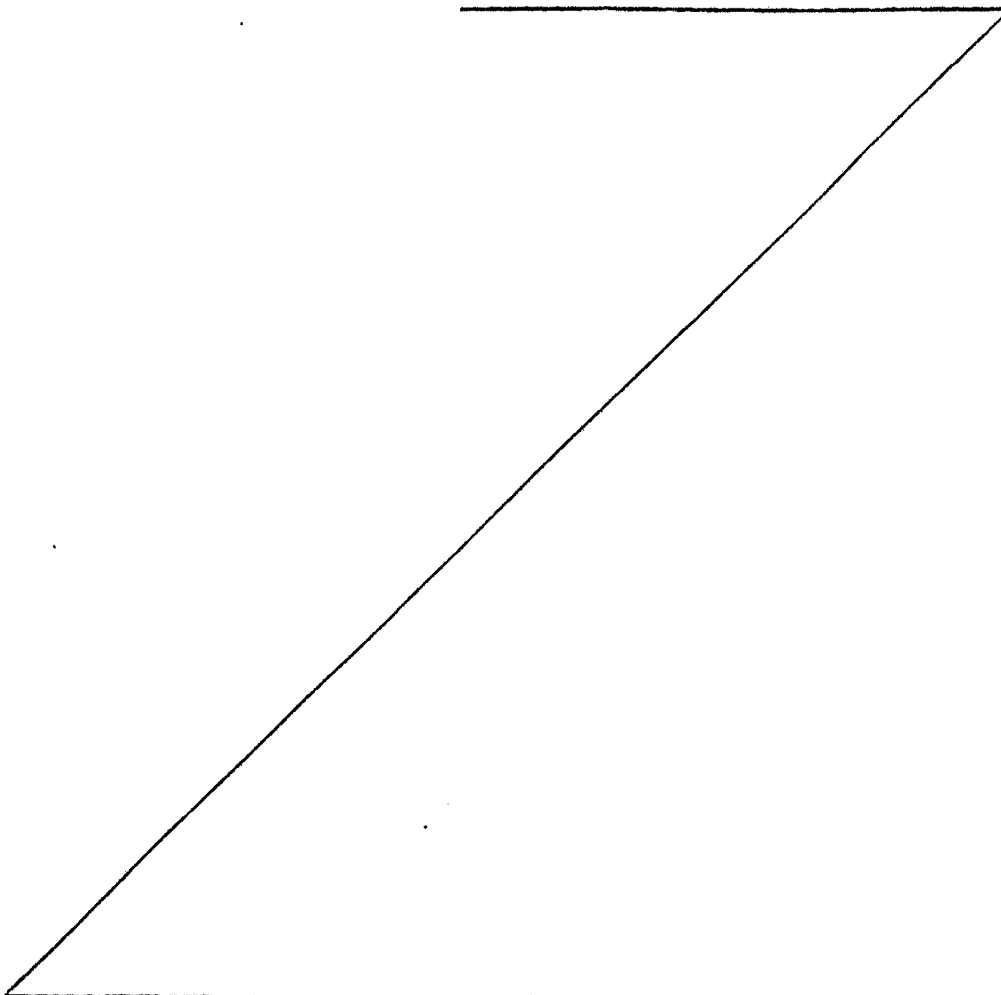
Una harina de cebada (grano molido y después clasificada por aire), que contenía 26,35 % de proteína (N x 6,25) se extrajo por espacio de 30 minutos a 35°C al nivel del 20 % peso/volumen en una solución de cloruro cálcico 0,5 M, el pH del sistema de extracción se mantuvo a 6,2 por adición de hidróxido sódico que se mezcló rápidamente en el sistema de solubilización. Después de separar el detritus celular y los gránulos de almidón, el extracto proteínico de elevado contenido salino se dializó contra agua fría. La reducción resul-

tante de potencia iónica hizo que se formaran micelios proteínicos que se recogieron por centrifugación para obtener el nuevo aislado proteínico.

EJEMPLO 13

5 Se elaboró una harina de centeno de una forma similar al de harina de cebada y harina de avena para producir un aislado proteínico de centeno.

10 Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle, en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

5 1ª.- Procedimiento para preparar un producto proteínico, como un aislado y en forma de micelas proteínicas, a partir de materiales proteínicos, caracterizado porque comprende: (a) extraer dichas proteínas sometiendo el material proteínico de origen a un tratamiento con una solución acuosa de sal de calidad alimenticia, a una temperatura de 15 a 35°C aproximadamente, una concentración de sal de al menos 0,2 de concentración iónica y un pH de 5,5 a 6,5 aproximadamente; 10 y (b) recuperar las proteínas solubilizadas en sal como micelas proteínicas, reduciendo la concentración iónica a menos de 0,1 y recogiendo las micelas precipitadas.

15 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además separar las micelas proteínicas y secarlas para obtener un aislado proteínico.

20 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque comprende además conformar las micelas proteínicas a fibras proteínicas texturadas por extrusión de las micelas en un baño de agua caliente y separación de las fibras del agua.

25 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los materiales proteínicos de partida contienen proteínas en asociación.

