

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①① Número de publicación: **2 144 356**

②① Número de solicitud: 009800009

⑤① Int. Cl.⁷: G01N 33/04
A23C 11/10

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

②② Fecha de presentación: **08.01.1998**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2000**

④③ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.06.2000

⑦① Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Colegio San Ildelfonso, Plaza San Diego s/n.
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑦② Inventor/es: **García López, María Concepción;
Marina Alegre, María Luisa y
Torre Roldán, Mercedes**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Procedimiento de detección ultrarrápida de proteínas de leche de vaca en productos de soja, por cromatografía líquida de alta eficacia.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento de detección ultrarrápida de proteínas de leche de vaca en productos de soja, por cromatografía líquida de alta eficacia.

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección ultrarrápida de proteínas de suero de leche de vaca por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa, en productos de tipo lácteo a partir de soja.

Este procedimiento que consiste en la realización de dicha cromatografía mediante la aplicación de un gradiente lineal y binaria en tres pasos usando acetonitrilo-agua-ácido trifluoroacético, a un flujo determinado por el tiempo del gradiente, a temperatura constante y con inyección de la muestra en disolución acuosa, permite separar rápida y simultáneamente proteínas de soja y de suero de leche de vaca en productos comerciales de tipo lácteo fabricados a partir de soja tales como bebidas de soja líquidas y en polvo -leches de soja-, fórmulas infantiles, yogures, batidos, etc.

ES 2 144 356 A1

DESCRIPCION

Procedimiento de detección ultrarrápida de proteínas de leche de vaca en productos de soja, por cromatografía líquida de alta eficacia.

Este método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa permite hacer una separación rápida y simultánea de proteínas de soja y proteínas de suero de leche de vaca (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulinas (A+B) con el fin de identificar y determinar cuantitativamente proteínas de suero de leche de vaca en productos comerciales de tipo lácteo elaborados a partir de aislado de proteína de soja (bebidas de soja líquidas y en polvo -conocidas como leches de soja-, fórmulas infantiles, yogures, batidos, etc.). Esta invención supone un gran avance para el análisis rutinario de control de calidad de estos productos.

Estado de la técnica

Aunque las proteínas de soja y las proteínas de suero de leche de vaca han sido caracterizadas y determinadas cuantitativamente por separado utilizando distintas técnicas (incluida la cromatografía líquida de alta eficacia), hasta hace poco no se habían separado simultáneamente ambos tipos de proteínas. En efecto, recientemente los autores de esta invención han diseñado un método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa que permite llevar a cabo la separación simultánea de ambos tipos de proteínas en un tiempo de análisis de 20 min y que es aplicable al análisis cuantitativo y a la detección de proteínas de suero de leche de vaca en productos comerciales de tipo lácteo elaborados a partir de aislado de proteína de soja (M.C. García, M. L. Marina y M. Torre, Anal. Chem., 69 (1997) 2217).

Sin embargo, en el análisis rutinario para el control de calidad, sería necesario disponer de métodos de análisis más rápidos y en consecuencia, se ha diseñado un método de análisis que permite realizar dicho control en unos pocos minutos y cuyas características son el objetivo de la presente invención.

Descripción de la invención

El método analítico que permite la determinación simultánea de proteínas de soja y proteínas de suero de leche de vaca por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) de perfusión en fase inversa se lleva a cabo en un cromatógrafo de líquidos de alta presión que permite realizar gradientes de composición de fase móvil y que tiene acoplado un detector de absorción ultravioleta-visible (UV-Vis) de longitud de onda variable. La columna cromatográfica utilizada es una columna con un relleno de perfusión en la modalidad de fase inversa.

El método consiste en un gradiente lineal y binario en tres pasos, cuyo volumen (Flujo x Tiempo del gradiente) es de 15 mL. Para un flujo de 3 mL/min (velocidad lineal de flujo de 1058 cm/hr), el gradiente diseñado es el siguiente: de 5 a 25 % de fase móvil (FM) B en 1,70 min, de 25 a 43 % FM B en 0,30 min y de 34 a 41 % de FM B en 3 min. Este gradiente va seguido de otro gradiente lineal e inverso de 41 a 5 % FM B en 1 min y 1 min a 5 % de FM B para re-equilibrar

la columna en las condiciones iniciales. La utilización de este gradiente a otros flujos es posible manteniendo el volumen del gradiente constante. Las fases móviles que se utilizan son: FM A, agua de grado CLAE con un 0,10 % (v/v) de ácido trifluoroacético; FM B, acetonitrilo de grado CLAE con un 0,10 % (v/v) de ácido trifluoroacético. Las fases móviles se filtran a través de membranas de nylon de 0,45 μ m y se desgasifican antes y/o durante su utilización.

La separación se lleva a cabo a una temperatura de columna constante e igual a 60°C y la detección se realiza a una longitud de onda de 254 nm.

El protocolo para la preparación de las muestras es el siguiente:

Protocolo A: Cuando las proteínas de suero de leche de vaca se encuentra en concentración elevada: se pesa la muestra (producto de tipo lácteo elaborado a partir de aislado de proteína de soja), se disuelve en un medio acuoso (agua de grado CLAE), se mezcla, se sonica (3 min) y se centrifuga para recoger el sobrenadante (1450g, 5 min), que se deja a una temperatura de 2 a 5°C hasta el momento de la inyección.

Protocolo B: Cuando las proteínas de suero de leche de vaca se encuentran en baja concentración se realiza una precipitación ácida de la muestra cuando se trata de leches líquidas o batidos (150 mL) o de una disolución de la muestra cuando se trata de una leche en polvo (50 mg/mL), fórmula infantil (200 mg/mL) o yogur (hasta disolución completa) a pH 4.6 con ácido clorhídrico 2 mol/L, seguida de una centrifugación (2000g, 20 min) para recoger el sobrenadante que se deja a una temperatura de 2 a 5°C hasta el momento de la inyección.

El método de análisis inventado permite la detección de proteínas de suero de leche de vaca en productos comerciales elaborados a partir de aislado de proteína de soja que imitan a lácteos. Asimismo, este método también permite determinar el contenido en proteínas de suero de leche de vaca de estos productos. El cromatograma correspondiente a una disolución preparada como mezcla de patrones de proteína de soja (aislado de proteína de soja) y de proteínas de suero de leche de vaca (α -lactoalbúmina (α -LA) y β -lactoglobulinas (β -LG) (A + B) (Figura 1) consta de 10 picos, de los cuales los siete primeros (picos 1-7) corresponden a las proteínas de soja, el pico 8 a la α -LA y los picos 9 y 10 a las β -LG (A + B). La asignación de estos picos se hizo por comparación de sus tiempos de retención con los que se obtienen cuando se inyectan en el sistema cromatográfico y en las mismas condiciones disoluciones acuosas de los patrones individuales.

Las ventajas de la utilización de este método y lo que aporta respecto del estado anterior de la técnica se citan a continuación:

- El método objeto de invención se puede realizar con una instrumentación básica y es, por tanto, accesible a la mayor parte de los laboratorios de análisis.

- El gradiente utilizado (tres pasos) permite la separación simultánea de las proteínas de la soja y de las proteínas de suero de leche de vaca.
- Se trata de un método sencillo, ya que no se necesita tratamiento previo de la muestra o los patrones. Las disoluciones de las muestras se preparan en agua de grado CLAE, lo cual reduce no sólo el tiempo de preparación de la muestra sino también el gasto en disolventes. Cuando de esta manera no se detectan proteínas de suero de leche de vaca y se quiere asegurar la ausencia de éstas en la leche de soja, se realiza una precipitación ácida de la muestra (para leches líquidas o batidos) o de una disolución de ésta (para una leche en polvo, fórmula infantil o yogur) a pH 4.6 con ácido clorhídrico 2 mol/L, seguida de una centrifugación (2000g, 20 min) para recoger el sobrenadante que contendría (si las hubiera) las proteínas del suero lácteo de vaca. Las disoluciones y/o los sueros obtenidos por precipitación ácida se inyectan directamente en el sistema cromatográfico, sin necesidad de utilizar filtros, lo cual también reduce tiempo de análisis y coste.
- Este método de análisis permite la separación y determinación ultrarrápida de estos dos tipos de proteínas, haciéndolo ideal en su aplicación industrial. Así, por ejemplo, si la separación se realiza a un flujo de 3 mL/min, el tiempo de análisis es de 5 min (a los que hay que sumar 2 min para re-equilibrar la columna a las condiciones iniciales), pudiéndose analizar hasta 205 muestras en 24 horas. No obstante, este tiempo de análisis puede ser reducido si se utilizan flujos de fase móvil más elevados (a 5 mL/min el tiempo de análisis se reduce a 3 min y en este caso se pueden analizar hasta 288 muestras en 24 horas).
- Este método permite la detección de adulteraciones debidas a la adición de proteínas de suero de leche de vaca a productos comerciales de tipo lácteo elaborados a partir de aislado de proteína de soja. Esto resulta muy interesante puesto que los productos de soja de tipo lácteo (leches, fórmulas infantiles, yogures, batidos, etc.) constituyen una interesante alternativa para aquellas personas, en especial niños, que presentan alergia a las proteínas del suero de leche de vaca, por lo que la presencia de adulteraciones debidas a la adición de α -LA y/o β -LG (A + B) en estos preparados a base de aislado de proteína de soja podría tener consecuencias no deseables (aparición de diarrea, deshidratación, vómitos, afecciones respiratorias, cutáneas y/o psíquicas).
- Este método permite cuantificar simultánea y separadamente proteínas de soja y proteínas de suero de leche de vaca, lo cual constituye una ventaja importante frente a los métodos existentes en los que se determina el contenido proteico a través del contenido

en nitrógeno total y que no permiten discriminar entre diferentes tipos de proteínas ni por tanto especificar cuál es el contenido de cada tipo de proteína en la muestra.

- 5 - El método desarrollado permite determinar el contenido en proteína de soja y proteínas de suero de leche de vaca en muestras con otros aditivos que contienen nitrógeno y para las cuales los métodos existentes para la determinación del nitrógeno total no permiten especificar el contenido en proteína de la muestra. Así, este método permite hacer una diferenciación entre el contenido total en proteína de soja, en α -LA y en β -LG (A + B) y el contenido en nitrógeno total para productos de tipo lácteo que además de estas proteínas contengan otros compuestos añadidos que contienen nitrógeno (aminoácidos, nucleótidos, vitaminas, etc.).

Descripción de las figuras

Figura 1: Cromatograma correspondiente a la separación simultánea de proteínas de soja y proteínas de suero de leche de vaca obtenido al inyectar una disolución acuosa que contiene patrón de proteína de soja (0,9456 mg/mL de aislado de proteína de soja) (protocolo A) y patrones de α -LA (0,0518 mg/mL) y β -LG (A + B) (0,4413 mg/mL). Condiciones experimentales: Flujo, 3 mL/min; Temperatura de columna, 60° C; Gradiente, 5-25 % FM B en 1,70 min, 25-34 % FM B en 0,30 min y 34-41 % FM B en 3 min (tiempo de gradiente de 5 minutos), seguido de un gradiente lineal inverso de 41 a 5 % FM B en 1 min y 1 min a 5 % de FM B para re-equilibrar la columna a las condiciones iniciales; Fases móviles, 0,10 % ácido trifluoroacético en agua (FM A) y 0,10 % ácido trifluoroacético en acetonitrilo (FM B); Volumen de inyección, 20 μ L; Detección, 254 nm.

Figura 2: Cromatograma correspondiente a la separación simultánea de proteínas de soja y proteínas de suero lácteo de vaca obtenido al inyectar un suero concentrado que proviene de una precipitación ácida (pH 4,6) (protocolo B) de una disolución (48,92 mg/mL) de una leche en polvo elaborada a partir de aislado de proteína de soja y comercializada para adultos en cuya formulación se adicionan suero lácteo de vaca. Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que las citadas en la Figura 1.

Figura 3: Cromatograma correspondiente a una disolución que contiene 1,9872 mg/mL de una leche en polvo (protocolo B) elaborada a partir de aislado de proteína de soja (comercializada para adultos y en cuya formulación no se adicionaban proteínas de suero de leche de vaca), 0,0605 mg/mL de patrón de α -LA y 0,5154 mg/mL de patrón de β -LG (A + B). Las condiciones cromatográficas fueron las mismas que se citaron en la Figura 1.

Modo de realización

A continuación se citan dos ejemplos de utilidad de este método.

Detección de proteínas de suero de leche de vaca en productos comerciales de tipo lácteo elaborados a partir de aislado de proteína de soja

El método se aplicó a la detección de proteínas de suero de leche de vaca en leches en polvo elaboradas a partir de aislado de proteína de soja y comercializadas para adultos. Se eligieron como representativas dos muestras de leche en polvo: una que contenía suero lácteo en su formulación y otra en la que no se especificaba la adición de suero de leche en el etiquetado.

Se preparan disoluciones de aproximadamente 3 mg/mL de las muestras de leche de soja, se agitan, se sonicán durante 3 min y se centrifugan durante 5 min a 1450g (protocolo A) para recoger el sobrenadante que se inyecta por triplicado en el cromatógrafo. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- Columna: Relleno de perfusión; tamaño de partícula de 10 μm ; dimensiones: 50 mm de longitud y 4,60 mm de diámetro interno.
- Gradiente: de 5 a 25 % FM B en 1,70 min; de 25 a 34 % FM B en 0,30 min; de 34 a 41 % FM B en 3 min (tiempo de gradiente 5 min), seguido de un gradiente lineal inverso de 41 a 5 % FM B en 1 min y 1 min a 5 % FM B para re-equilibrar la columna a las condiciones iniciales.
- Flujo: 3 mL/min.
- Fases móviles: FM A, agua de grado CLAE con 0,10 % (v/v) de ácido trifluoroacético; FM B, acetonitrilo con 0,10 % (v/v) de ácido trifluoroacético.
- Temperatura de la columna: 60°C.
- Volumen de inyección: 20 μL .
- Detección: 254 nm.

Cuando se inyectaron estas disoluciones se obtuvieron cromatogramas en los que no aparecían picos correspondientes a la α -LA y β -LG (A + B), lo que en un principio podía inducir a pensar en la no existencia de proteínas de suero de leche de vaca. No obstante, para asegurar los resultados se procedió a la concentración de las muestras y nueva inyección de éstas en el sistema cromatográfico. Para ello, se realizó una precipitación ácida a pH 4,6 con ácido clorhídrico 2 mol/L de disoluciones de aproximadamente 50 mg/mL de las leches en polvo, seguida de una centrifugación (2000g, 20 min) (protocolo B). De esta manera quedan precipitadas la mayor parte de las proteínas de soja y las proteínas de suero de leche de vaca quedarían concentradas en el sobrenadante.

Al inyectar los sobrenadantes (sin diluir) en el sistema cromatográfico en las mismas condiciones en las que se inyectaron las disoluciones de las leches, es posible detectar pequeñas cantidades de proteínas de suero de lácteo de vaca en la leche en cuya etiqueta se especificaba la adición de éste. En la Figura 2 se muestra el cromatograma obtenido para un suero (preparado por precipitación

ácida a pH 4,6) de dicha leche en polvo elaborada a partir de aislado de proteína de soja y comercializada para adultos en la que se detectaron proteínas de suero de leche de vaca. Los primeros picos (picos 1-5) corresponden a las proteínas de soja que no han precipitado, el pico 8 a la α -LA y los dos últimos picos (pico 9 y 10) a las β -LG (A + B).

En la Figura 3 se muestra el cromatograma obtenido al inyectar una disolución (protocolo A) de la leche en polvo elaborada a partir de aislado de proteína de soja que no contenía proteínas de suero de leche de vaca en su formulación y a la que se ha añadido patrón de α -LA y de β -LG (A + B). En el cromatograma se observan los siete picos correspondientes a las proteínas de soja (picos 1-7) y los tres picos de las proteínas de suero de leche de vaca (pico 8, α -LA y picos 9 y 10, β -LG (A + B)).

Determinación cuantitativa del contenido en proteínas de suero lácteo de vaca de una leche elaborada a partir de aislado de proteína de soja comercializada para adultos

Se prepara una disolución acuosa de patrón de α -LA de aproximadamente 0,12 mg/mL y otra de β -LG (A + B) de aproximadamente 1 mg/mL siguiendo el mismo protocolo que se ha seguido para la preparación de las disoluciones de las muestras. A partir de estas disoluciones patrón concentradas, se preparan disoluciones de ambos patrones en menor concentración. Para ello, se toman alícuotas de las disoluciones y se diluyen en agua. De esta manera, se obtienen disoluciones independientes que contienen patrón de α -LA en concentraciones comprendidas entre 0,02 y 0,10 mg/mL y patrón de β -LG (A + B) en concentraciones comprendidas entre 0,16 y 0,85 mg/mL.

Una vez preparadas las disoluciones patrón se procede a realizar el calibrado por el método del patrón externo, para lo cual se inyectan por triplicado cada una de las disoluciones patrón (que contienen α -LA y β -LG (A + B)) en las mismas condiciones cromatográficas especificadas en el apartado anterior.

Calibrado

Las curvas de calibrado se obtienen representando el área de pico para la α -LA y el área total (calculada como suma de las áreas de los picos correspondientes a la β -LG (A) y la β -LG (B)) para la β -LG (A + B) en función de la concentración inyectada del patrón correspondiente (corregido teniendo en cuenta la pureza). El análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales del calibrado que se ajustan a un modelo lineal dio lugar a los siguientes resultados:

$$\alpha\text{-LA: } y = 224,50 x - 1,95; r^2 = 0,9994; n = 5; \text{ error estándar de la recta} = 0,3214$$

$$\beta\text{-LG (A + B): } y = 39,09 x - 3,78; r^2 = 0,9992; n = 4; \text{ error estándar de la recta} = 0,5523$$

donde y es el área del pico correspondiente a la α -LA y el área total correspondiente a la suma de los dos picos de la β -LG (A + B) y x es la concentración en proteína de la disolución patrón.

Los intervalos de linealidad y límites de detección del método analítico se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

| | α -LA | β -LG (A + B) |
|--------------------------|---------------------|---------------------|
| Intervalos de linealidad | 0,0173-0,1020 mg/mL | 0,1738-0,8347 mg/mL |
| Límite de detección | 4,30 μ g/mL | 47,1 μ g/mL |

Determinación cuantitativa de α -LA y β -LG (A + B)

Una vez obtenida la recta de calibrado, se inyecta el suero obtenido por precipitación ácida

de una disolución de 48,92 mg/mL de la leche en polvo elaborada a partir de aislado de proteína de soja comercializada para adultos en la que se habían encontrado proteínas de suero de leche de vaca. Tras interpolar el área del pico correspondiente a la α -LA y el área total suma de los dos picos correspondientes a la β -LG (A + B) en sus correspondientes rectas de calibrado obtenidas con patrones que contienen ambas proteínas, se encuentra que la leche en polvo a base de soja para adultos utilizada contiene $0,355 \pm 0,015$ mg de α -LA por 100 mg de leche y $0,453 \pm 0,114$ mg de β -LG (A + B) por 100 mg de leche.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de proteínas de leche **caracterizado** porque comprende la detección y cuantificación ultrarrápida de proteínas de suero de leche de vaca y proteínas de soja por cromatografía líquida de alta eficacia de perfusión en fase inversa.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la cromatografía de alta eficacia de perfusión en fase inversa comprende la aplicación de un gradiente lineal.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2 **caracterizado** porque en la realización de dicha cromatografía se usan dos fases móviles.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dichas fases móviles son: FM A: agua con ácido trifluoroacético y FM B: acetonitrilo con ácido trifluoroacético.

5. Procedimiento según la reivindicación 4 **caracterizado** porque dichas fases móviles contienen ácido trifluoroacético en una proporción de 0,10% (v/v).

6. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque dicho gradiente de volumen constante se puede conseguir utilizando distintos flujos de fase móvil.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dicho gradiente es el siguiente: para un flujo de 3 ml/min: 5-25% de FM B en 1,70 min, 25-34% de FM B en 1,30 min y 34-41% de FM B en 3,0 min, seguido de una etapa de reequilibrado de la columna a las condiciones iniciales.

8. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende realizar una cromatografía en una columna de perfusión de fase inversa con unas dimensiones de columna y un tamaño de partícula apropiados.

9. Procedimiento según la reivindicación 8 **caracterizado** porque la columna tiene una longitud de 50 mm y un diámetro interno de 4,6 mm y el tamaño de partícula es de 10 μ m.

10. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la detección se realiza mediante un detector de absorción UV-visible

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la longitud de onda utilizada es 254 nm.

12. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para concentración alta de proteínas de suero lácteo de vaca comprende las etapas de:

- pesada de la muestra
- disolución en el disolvente
- agitación manual
- ultrasonificación
- centrifugación para recoger el sobrenadante e
- inyección del sobrenadante en el sistema cro-

matográfico.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque las muestras se disuelven en agua.

14. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque las muestras se sonicán durante 3 minutos.

15. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque las muestras se centrifugan a 1450g durante 5 minutos.

16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, **caracterizado** porque la columna se mantiene a una temperatura constante.

17. Procedimiento según la reivindicación 16 **caracterizado** porque la temperatura de la columna es de 60°C.

18. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque para concentración baja de proteínas de suero lácteo de vaca comprende las etapas de:

- pesada de la muestra,
- disolución en agua
- precipitación ácida,
- centrifugación para recoger el sobrenadante e
- inyección del sobrenadante en el sistema cromatográfico.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque para el caso de leches líquidas o batidos se realiza la precipitación ácida de la muestra líquida.

20. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque para el caso de leches en polvo, fórmulas infantiles o yogures se realiza la precipitación ácida de una disolución de la muestra.

21. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la precipitación se lleva a cabo a pH 4,6.

22. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la precipitación se lleva a cabo con ácido clorhídrico

23. Procedimiento según la reivindicación 22, **caracterizado** porque la concentración de ácido clorhídrico es de 2 mol/L.

24. Procedimiento según la reivindicación 18, **caracterizado** porque la centrifugación de la muestra precipitada se realiza a 2000g durante 20 min.

25. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las proteínas de la leche de vaca que se detectan y separan son α -lactoalbúmina y β -lactoglobulinas (A +B).

26. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se pueden detectar y cuantificar varias proteínas simultáneamente.

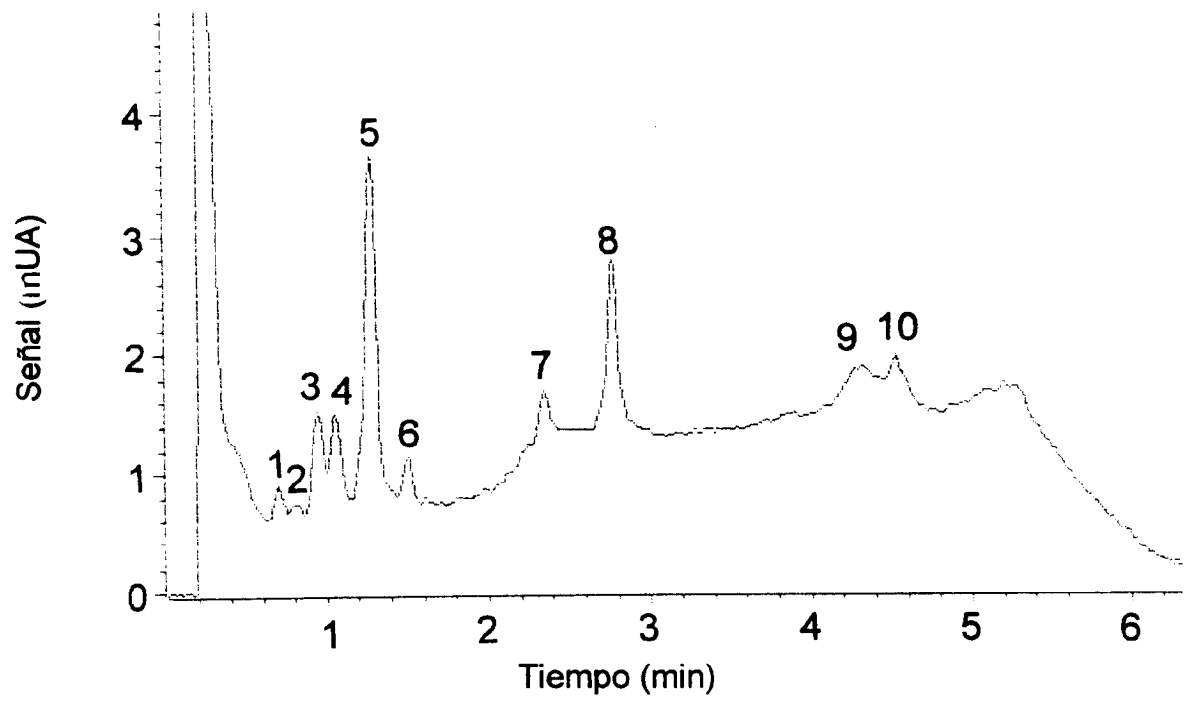


Figura 1.

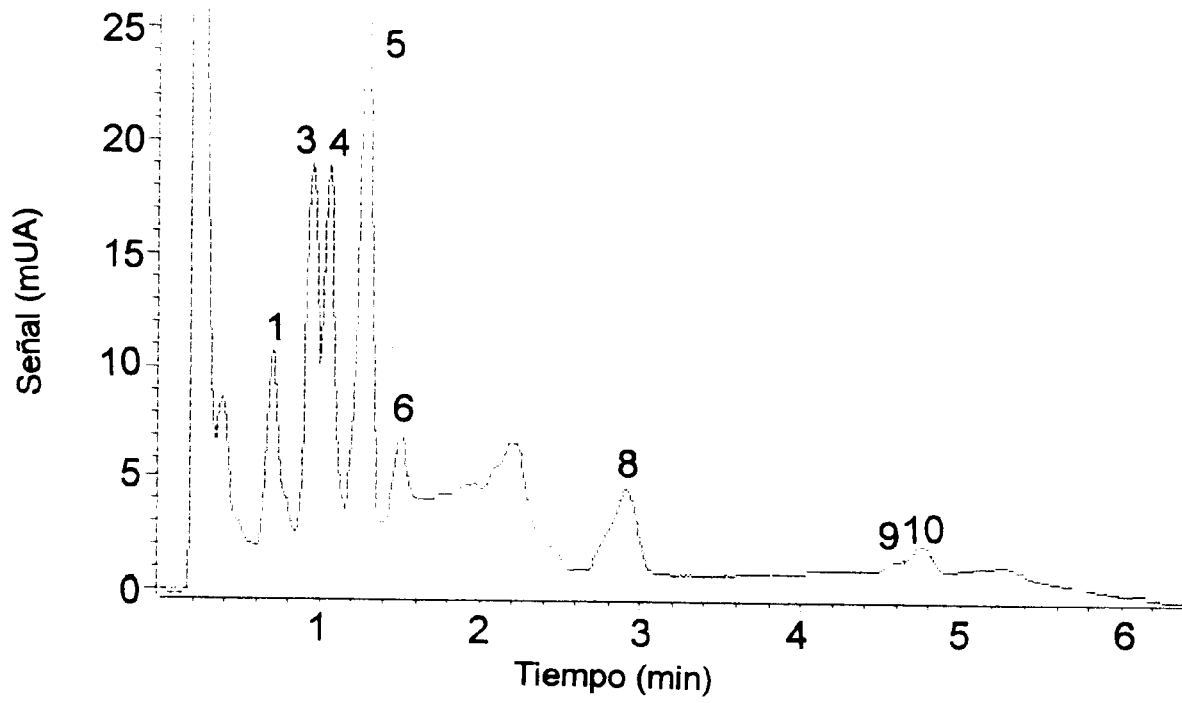


Figura 2.

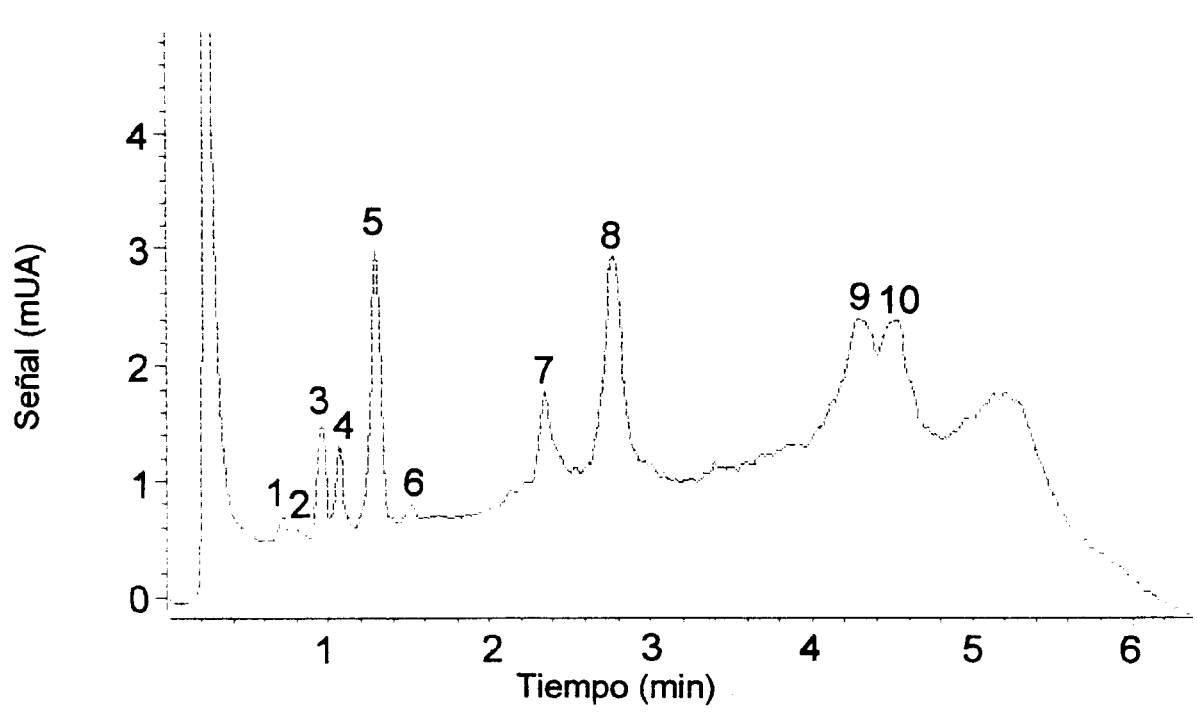


Figura 3.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: G01N 33/04, A23C 11/10

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | TORRE, M. et al. "Perfusion liquid chromatography of whey proteins". JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A., Vol. 729, 1996, páginas 99-111, todo el documento. | 1-26 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

29.03.2000

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1