



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 154 182**

21 Número de solicitud: 009802055

51 Int. Cl.⁷: A23J 1/06
A23K 1/04

12

PATENTE DE INVENCION

B1

- 22 Fecha de presentación: **02.10.1998**
- 43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2001**
- Fecha de concesión: **23.04.2002**
- 45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.06.2002**
- 45 Fecha de publicación del folleto de patente: **16.06.2002**

- 73 Titular/es: **Universidad de Oviedo
33003 Oviedo, Asturias, ES**
- 72 Inventor/es: **Díaz Fernández, José Mario;
Rendueles de la Vega, Manuel;
Moure Fernández, Fernando y
Paredes García-Viniegras, Benjamín**
- 74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para la recuperación y purificación de la globina de la sangre de animales de abasto y su utilización en productos alimentarios.**

57 Resumen:

Procedimiento para la recuperación y purificación de la globina de la sangre de animales de abasto y su utilización en productos alimentarios.

Procedimiento para recuperar y purificar la globina procedente de la sangre de los animales de abasto siguiendo procesos físico-químicos de extracción, precipitación y filtración. Para ello, la sangre se separa inicialmente en sus componentes principales (plasma y células) por centrifugación. Las células son hemolizadas con agua, los desechos celulares y estroma son extraídos utilizando cloroformo y de la disolución acuosa obtenida de hemoglobina se separa el grupo hemo de la globina por precipitación de esta con acetona. Dependiendo de los posibles usos la proteína resultante puede ser decolorada con peróxido de hidrógeno y el exceso de éste eliminado por vía enzimática. Para los productos finales obtenidos (globina decolorada y sin decolorar) se han desarrollado procedimientos de acondicionamiento e integración en masas alimentarias.

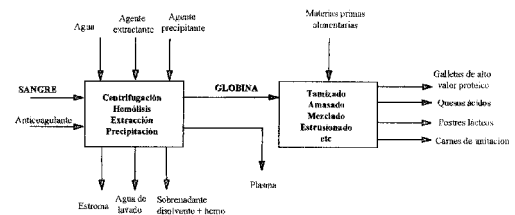


Figura 1

ES 2 154 182 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Procedimiento para la recuperación y purificación de la globina de la sangre de animales de abasto y su utilización en productos alimentarios.

La presente invención se refiere a un procedimiento para extraer y purificar globina, proteína procedente de sangre de mataderos industriales, y el uso del producto obtenido en productos alimentarios.

Estado de la técnica

Uno de los problemas más importantes que presenta actualmente la industria cárnica, y especialmente los mataderos, es la elevada cantidad de subproductos que genera, siendo la sangre uno de los más complejos por el elevado volumen producido y por su gran poder contaminante.

El aprovechamiento óptimo de la sangre pasa por el desarrollo de procesos que permitan la recuperación de las proteínas, pudiendo beneficiarse de su uso la industria alimentaria y otras.

Los procedimientos conocidos de obtención de globina de la sangre de animales de abasto son antiguos y poco desarrollados, tanto para la globina decolorada como sin decolorar (Tybor, P. T., Dill, C. W. and Landmann (1975), *Functional properties of proteins isolated from bovine blood by a continuous plant process*, J. Food Sci., 40, 155), existen varias propuestas desde el punto de vista operacional (Ockerman, H. W., Hansen, C. L., *Industrialización de Subproductos de Origen Animal*, Ed. Acribia S.A., Zaragoza, 1994, pp 249-253) (Riggs, A., *Preparation of Blood Hemoglobins of Vertebrates*, Methods in Enzymology, 1981, Vol. 76, pp 5-13). Los primeros trabajos de referencia debidos a Tybor van dirigidos a la obtención de globina decolorada directamente, donde el producto final presenta numerosas impurezas que lo hacen poco adecuado para ser utilizado en la industria alimentaria, si bien se han determinado sus propiedades funcionales (solubilidad, capacidad espumante y emulsionante) adecuadamente. Posteriores trabajos (Nava R., Universidad de Zulia, Facultad Experimental de Ciencias. Departamento de Química, Maracaibo, Venezuela) se han limitado a emplear peróxido de hidrógeno, mezclado con acetona para llevar a cabo la decoloración de la globina y sin eliminación final de los posibles restos del mismo (de alta toxicidad para los tejidos digestivos) conduciendo a un producto final poco soluble, de difícil secado y que requiere un control analítico previo a su utilización en alimentación.

En el procedimiento objeto de la presente invención a) se han introducido las modificaciones técnicas necesarias para obtener un producto con mejores propiedades funcionales y b) se han desarrollado procedimientos de acondicionamiento del producto obtenido que permiten su integración directa en diversos sistemas alimentarios. Así, las variantes introducidas en el proceso de obtención de globina de la presente invención son fundamentalmente:

- Adición de la solución de hemoglobina sobre el agente precipitante.
- Fijación simultánea de las condiciones de

operación en cuanto a pH, temperatura y tiempo de operación.

- Realización de la decoloración después de la operación de precipitación obteniendo globina más decolorada y soluble.
- Eliminación del exceso de disolvente presente en el precipitado de globina mediante procesos de arrastre con agua y/o secado en condiciones prefijadas.
- Eliminación del exceso de agente decolorante, agua oxigenada, mediante un proceso enzimático.

Finalmente, y por otro lado, se ha desarrollado un procedimiento de acondicionamiento de la globina para su empleo en algunos productos alimenticios dietéticos y de imitación, así como el desarrollo de formulaciones y métodos para la elaboración de algunos de dichos productos.

Breve descripción de la invención

La invención configura un procedimiento físico-químico de recuperación de globina decolorada y sin decolorar a partir de la sangre de animales de abasto, con resultado de unos productos finales de gran pureza técnica y sanitaria utilizables en la elaboración de productos alimentarios. El procedimiento citado consta de las siguientes etapas:

- anticoagulación de la sangre procedente del matadero con el empleo de productos de origen natural (citrato sódico).
- separación de la fracción líquida (plasma) de la sangre de la fracción celular por centrifugación.
- hemólisis de los hematíes para liberar la hemoglobina de interés
- extracción del estroma celular mediante la utilización de cloroformo como fase orgánica.
- Precipitación de la parte proteica de la hemoglobina (globina) mediante la adición de acetona y eliminación del grupo no proteico (hemo) que permanece en disolución.
- decoloración del producto por técnicas originales basadas en el uso del peróxido de hidrógeno.
- Eliminación del exceso de peróxido de hidrógeno por vía enzimática original.
- Acondicionamiento de la globina decolorada obtenida por ajuste simultáneo de pH y aromas con productos de origen natural.
- Desarrollo de una tecnología simple para la fabricación de galletas de alto valor proteico, carnes de imitación y pastas finas reforzadas, y pastas de surimi reforzadas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un diagrama de bloques del procedimiento objeto de la invención.

En la Figura 2 se muestra un esquema del método de obtención de las distintas variedades de globina y sus aplicaciones.

La Figura 3 muestra el esquema del proceso de obtención de galletas dietéticas de alto valor proteico.

Descripción detallada de la invención

A) Obtención de los productos bases

El procedimiento de obtención de las dos formas de globina objeto de esta invención comprende las etapas que se describen a continuación:

- *Anticoagulación.* Se realiza por la adición a la sangre de matadero de un agente natural (citrato sódico al 2 %) capaz de eliminar los iones calcio del medio, cuya presencia es imprescindible en la coagulación.
- *Separación de plasma y fracción celular.* Se realiza mediante centrifugación en condiciones de 1200g, 30 min y 4°C.
- *Hemólisis de la fracción celular.* Tiene como fin la ruptura de las membranas celulares por shock osmótico. Se utiliza igual volumen de agua que de células y agitación constante 50 rpm en un tanque de 10 cm de diámetro a 4°C durante 5 minutos.
- *Extracción del estroma celular.* Se realiza mediante la adición de cloroformo en relación de volúmenes 4:1 (hemolizado: cloroformo). Una vez terminada la adición, se agita durante 20 minutos a 50 rpm en un tanque de 10 cm de diámetro y a 4°C. Posteriormente se deja la mezcla en reposo durante 10 minutos para que la fase orgánica se separe (queda en la parte inferior) de la fase acuosa (parte superior). La fase acuosa conteniendo la hemoglobina se separa de la fase orgánica que se elimina como residuo.
- *Separación de la fracción proteica.*

Se lleva a cabo por adición de la fase acuosa anterior sobre acetona.

Dependiendo de las propiedades, formas y aspectos que se deseen en el producto final, esta fase se realiza de dos modos diferentes:

- *Elaboración de la globina.*

i) Obtención de globina sin decolorar.

Se carga el tanque con acetona de forma que la temperatura debe ser en todo momento entre 0 y -5°C lo que supone la necesidad de monitorizar la misma. Sobre la disolución de acetona se realiza la adición de la solución de hemoglobina a 2°C. Se le adiciona continuamente la solución de hemoglobina en agua hasta alcanzar una relación acetona:solución de hemoglobina de 3:1 sin dejar de agitar. Cuando se completa la adición de hemoglobina se sigue agitando 15 minutos para conseguir el equilibrio. Una vez finalizada la precipitación se separan las dos fases mediante filtración o centrifugación. La eliminación de los restos de disolvente presente en el precipitado se realiza mediante dos ciclos de lavado con agua y a

continuación se procede a un secado del producto a vacío a una temperatura de 30-35°C. El producto final posee buena solubilidad y es idóneo para su empleo en fórmulas alimentarias de imitación o de finalidad dietética en las que el color no sea un factor excluyente.

ii) Obtención de globina decolorada.

El proceso de precipitación de la globina es similar al caso anterior. Antes de realizar la separación del precipitado de globina se realiza la decoloración mediante la utilización de peróxido de hidrógeno de 100 volúmenes como agente decolorante en proporción 9:1 (disolución:peróxido de hidrógeno). Una vez finalizada la adición se deja equilibrar el proceso de decoloración unos 30 minutos.

Las dos fases se separan mediante centrifugación. La eliminación del exceso de disolvente en el precipitado se realiza mediante dos ciclos de lavado con 10 veces el volumen de precipitado y a continuación se practica una eliminación enzimática del exceso de peróxido, de hidrógeno con catalasa. El enzima se añade en disolución para alcanzar una concentración final en el precipitado de 0,25% en peso y se deja actuar 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se seca a vacío a una temperatura de 30-35°C hasta alcanzar un 5% de humedad. En estas condiciones y tras una operación de acondicionamiento el producto puede ser integrado en una fórmula alimentaria.

Todas las operaciones encaminadas a la obtención de las distintas formas de globina se llevan a cabo de forma aséptica, independientemente del efecto bactericida producido por los disolventes orgánicos utilizados. En el caso de la globina decolorada, el agua oxigenada refuerza dicho efecto.

Los líquidos sobrenadantes obtenidos en cada precipitación son prácticamente iguales en composición: acetona, derivados del grupo hémico, hierro hémico, impurezas. Así pues, los tratamientos para la separación y recuperación de componentes son análogos. Para la recuperación del agente precipitante se realiza una destilación a vacío donde se consigue separar la mayor parte de acetona en el destilado del resto de componentes en colas. Esta acetona se recicla al tanque para ser reutilizada en la etapa de precipitación. Igualmente se recupera el cloroformo utilizado en la etapa de extracción mediante una destilación a vacío.

El uso de otros agentes decolorantes de uso alimentario (ozono, clorofila, carbón activado o alginato sódico) tiene el inconveniente de resultar más caro o de más difícil eliminación.

B) Integración en sistemas alimentarios

Para la elaboración de productos alimentarios con las dos formas de globina obtenidos se ha procedido del siguiente modo:

I) Galletas dietéticas de alto nivel proteico

Se emplea globina decolorada. El acondicionamiento de la globina, descrito en la Figura 3, se realiza del siguiente modo:

a) Humectación del producto hasta un 40% de humedad y tamponado por amasado en presencia de 20 ml de disolución de cítrico/citrato sódico a partes iguales al 5% por cada kg de globina humedecida, o hasta conseguir que el pH de

la proteína húmeda se reduzca en 0,4 unidades, hasta pH=6,6 aproximadamente. La regulación de pH se puede hacer asimismo con la cantidad equivalente de zumo de limón o, con resultados algo inferiores, con los sistemas tartárico/tartrato, láctico/lactato y oxálico/oxalato.

b) Secado con vacíos correspondientes a temperaturas igual o inferior a los 50°C hasta contenido en humedad inferior al 10 %.

c) Molienda del producto en molino de cuchillas hasta granulometría media inferior a los 0,5 mm de diámetro.

d) Tamizado del producto a diámetro menor de 0,5. Los granos de más de 0,5, en general menos del 20 %, se remuelen y reciclan.

La sustitución parcial e incorporación de la globina en la harina de trigo se realiza recubriendo por amasado en presencia de igual cantidad de harina de trigo, las partículas de globina. Se añade a continuación el resto de harina de trigo de la fuerza y grado de extracción deseado (70 % de extracción, por ej.) hasta una relación harina/globina comprendida entre 3/1 a 4/1, y se amasa en amasadora.

A modo de ejemplo, se describe una forma de realización de galletas de muy alto contenido proteico que dobla el contenido proteico de una galleta normal:

En una mezcladora se amasan los ingredientes (huevo, azúcar, grasas, glucosa, aromas naturales, impulsor, etc.) con la fórmula indicada a continuación y calculada para 1000 gramos de harina base del 70 % grado de extracción y 200 gramos de globina g decolorada.

Componente	Cantidad
Margarina vegetal de repostería	400 grs.
Huevo completo	200 grs.
Glucosa	8 grs.
Aroma de limón	20 grs.
Azúcar glacé	400 grs.
Agente impulsor (HCO ₃ Na)	25 grs.
Almidón modificado con epiclorigidina	120 grs.
Agua	80 grs.
pH masa (ajuste con sistema cítrico/citrato)	6,65
Total gramos aprox. (incluido harina y globina)	2500
Total aprox. tras cocer	2200

Los aromas pueden ser añadidos en la etapa de acondicionamiento de la globina, en la disolución reductora de pH.

La mezcla anterior (salvo almidón y agua) se une ahora con la harina con la globina ya integrada, y se amasa al tiempo que se añade la cantidad estipulada de agua con el almidón requerido y modificado en su caso, sin dejar de amasar todo conjuntamente hasta hornogeneidad.

Se somete la mezcla homogénea a la extrusión y conformación deseadas. Se mantiene la masa en reposo un cuarto de hora. Se hornea la masa a temperaturas de solera (180°C o más) y techo

(200°C o más). Se deja enfriar el producto y se le da la cobertura y decoración que se desee. Se deja reposar media hora y envasa.

La galleta obtenida de esta forma presenta las siguientes ventajas:

- Su valor energético es similar al de una galleta normal (4,5 cal/g), mientras su contenido proteico puede ser de 1,5 a 2 veces superior, con lo cual su consumo es recomendable en deportistas, en enfermos cardiacos y en casos de errores metabólicos hereditarios.

- La integración de la globina en la masa es muy aceptable, dándole un atractivo aspecto artesano e integral. Se puede someter a diversos tipos de decoración, incluso también de base proteica.

- Su evaluación organoléptica la califica en cuanto producto dietético como de primer nivel en lo relativo a aspecto, textura y aroma.

II) Otras aplicaciones

A modo de ejemplo, se describen someramente procedimientos desarrollados para la elaboración de otros productos alimentarios.

- Productos cárnicos de imitación.

La hamburguesa de imitación con presentación precocinada y ultracongelada se obtiene a partir de una mezcla de vegetales diversos muy picados, con grasas escaldadas de alto punto de fusión y una mezcla de proteína de soja con globina sin decolorar a partes iguales. El producto se amasa en presencia de agua conteniendo aromas, colorantes y antioxidantes, almidón modificado y goma xantana, se extrusiona, prefríe y ultracongela. La cantidad final de proteína en el producto puede llegar al 20 % y la de grasa al 15 %, con 5 % de hidratos de carbono. Casi el 60 % sería agua.

- Pastas cárnicas finas de alto contenido en proteína (pasta tipo bolonia reforzada en proteína)

Una masa base compuesta de 2,5 kg de carne de vaca, 2,5 kg de carne de cerdo, 2,5 litros de hielo, 0,8 kg de almidón de maíz y 1 kg de tocino, acompañada de especias y color a gusto se pasa por una cutter de 10 kg de capacidad durante el tiempo necesario para que no se aprecien restos de tejidos en la masa (10 minutos aprox.). Sin extraer la masa de la cutter se añade ahora 0,5 kg de globina decolorada y acondicionada a pH 6,6 suspendidos en dos litros de agua fría, y se amasa durante otros 10 minutos. El pH final de la masa debe ser ligeramente inferior a 6. La masa queda así lista para embutir en tripa de Bolonia (15x50 cms) y escaldar a 80°C durante dos horas.

- Pastas de surimi reforzada en proteínas para elaborar productos de imitación (palitos de cangrejo).

A 1 kg de una masa base de surimi obtenida por procedimiento standard a partir de pescado blanco (abrir, eviscerar, lavar, eliminar piel y huesos, picar el músculo, lavado continuo de la masa y centrifugada finalmente) se añaden 150 gramos de surimi suspendidos en igual cantidad de agua y se amasan en cutter durante diez minutos (pH final de la masa 5,7). La masa así obtenida puede

ahora ser congelada (en este caso el amasado se hace en presencia de 25 gramos de sacarosa y 25 gramos de cloruro sódico) hasta su uso o ser usada

inmediatamente para elaborar palitos de cangrejo por procedimiento standard.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la recuperación y purificación de globina, procedente de hemoglobina de sangre de animales de abasto. El proceso se realiza inicialmente por centrifugación de la sangre para separar la fracción celular (conteniendo la hemoglobina) del plasma y una posterior hemólisis con igual volumen de agua que de células. A continuación se realiza una extracción del estroma por medio de cloroformo (en relación de volúmenes 4:1 hemolizado:cloroformo) obteniéndose una fracción acuosa conteniendo la hemoglobina. Finalmente el proceso se **caracteriza** por la adición de la disolución acuosa de hemoglobina sobre acetona (en relación de volúmenes 1:3, disolución de hemoglobina: acetona) produciéndose la precipitación de la globina.

2. Procedimiento para la recuperación y purificación de globina, según la reivindicación anterior, **caracterizado** por la fijación simultánea de las condiciones de operación en cuanto a pH, temperatura y tiempo de operación de forma que se obtiene globina sin decolorar.

3. Procedimiento para la recuperación y purificación de globina, según la reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por la realización de la decoloración con peróxido de hidrógeno al 30 % (relación de volúmenes 1:4, peróxido:disolución) después de la operación de precipitación y por la obtención de globina decolorada soluble.

4. Procedimiento para la recuperación y purificación de globina, según la reivindicaciones 1, 2 y 3, **caracterizado** por la eliminación del exceso de acetona presente en el precipitado de globina mediante procesos de arrastre con agua y/o secado en condiciones prefijadas.

5. Procedimiento para la recuperación y pu-

rificación de globina, según la reivindicaciones 1, 2, 3 y 4, **caracterizado** por la eliminación del exceso de peróxido de hidrógeno mediante un proceso enzimático utilizando catalasa.

6. Procedimiento para el acondicionamiento de la globina obtenida según las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por las siguientes etapas: humectación y tamponado, aromatización, secado, molienda y clasificación del producto. De forma que el producto puede ser utilizado directamente en masas alimentarias.

7. Aplicación de la globina decolorada, acondicionada según reivindicación 6, en la elaboración de galletas dietéticas de alto nivel proteico.

8. Aplicación de la globina sin decolorar y decolorada acondicionada según la reivindicación 6 en la elaboración de otros productos alimentarios, como hamburguesa de imitación, pastas cárnicas finas reforzadas en proteína y pastas de surimi.

9. Aplicación de la globina sin decolorar y decolorada acondicionada según la reivindicación 6 en la elaboración de otros productos alimentarios, (lácteos, cárnicos, entre otros) donde resulte de interés:

- a) un alto contenido proteico, mejorando las propiedades nutritivas y/o
- b) aprovechar sus propiedades funcionales (solubilidad, poder espumante, poder emulsionante)

10. Aplicación de la globina sin decolorar y decolorada acondicionada según la reivindicación 6 en otros productos no alimentarios (materiales, pegamentos, tejidos biodegradables) donde resulten de interés sus propiedades de adhesión, capacidad de hilado, biodegradabilidad y otras.

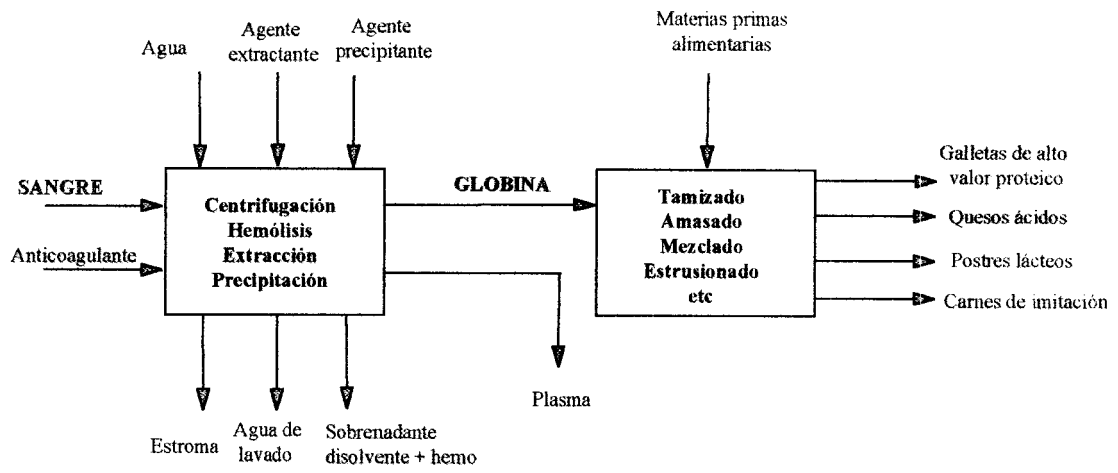


Figura 1

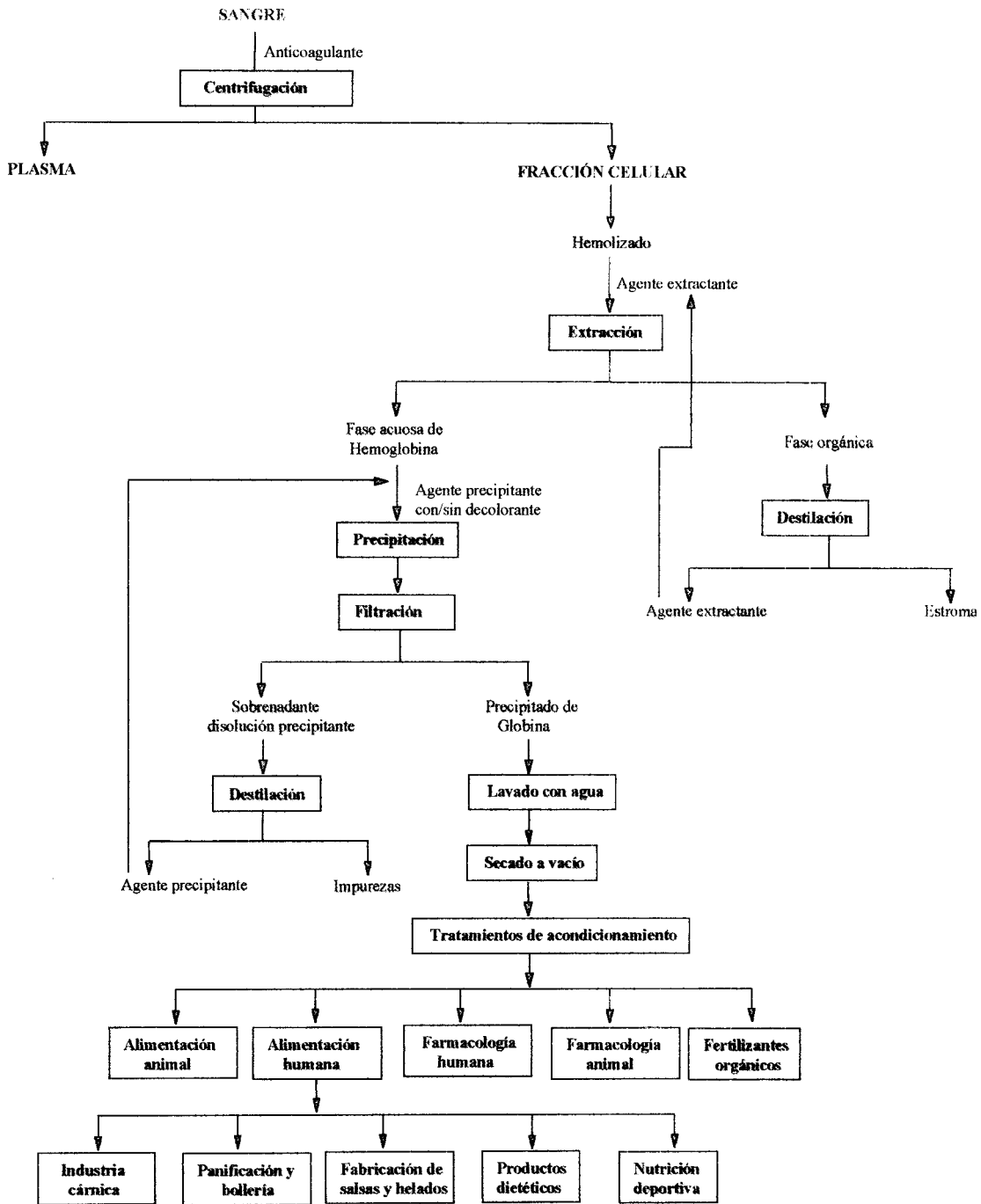


Figura 2

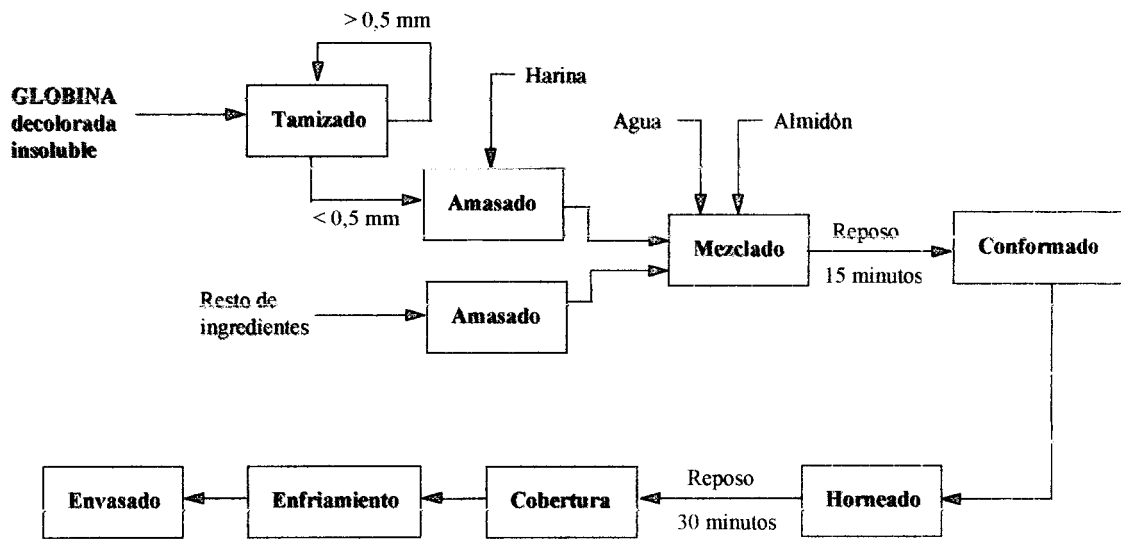


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 154 182
② N.º solicitud: 009802055
③ Fecha de presentación de la solicitud: 02.10.1998
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A23J 1/06, A23K 1/04

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0013055 A1 (UNILEVER NV) 09.07.1980	
A	US 4180592 A (KEITH BUCKIEY et al.) 25.12.1979	
A	WO 8303198 A1 (VALTION TEKNILLINEN TUTKIMUSKESKUS) 29.09.1983	
A	FR 2568102 A1 (ADRIA ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPMENT DE LA RECHERCHE APPLIQUEE AUX INDUSTRIES AGRICOLES ET ALIMENTAIRES) 31.01.1986	

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

30.12.2000

Examinador

M. Ybarra Fernández

Página

1/1