



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 364 130**

(51) Int. Cl.:

A23J 1/14 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **02769110 .4**

(96) Fecha de presentación : **03.05.2002**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1389920**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2004**

(54) Título: **Producción de aislado de proteína de semilla de aceite.**

(30) Prioridad: **04.05.2001 US 288415 P**
05.10.2001 US 326987 P
07.11.2001 US 331066 P
28.11.2001 US 333494 P
24.04.2002 US 374801 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2011

(73) Titular/es: **BURCON NUTRASCIENCE (MB) Corp.**
1946 West Broadway
Vancouver, British Columbia V6J 1Z2, CA

(72) Inventor/es: **Barker, Larry, D.;**
Martens, Ronald, W. y
Murray, E., Donald

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de aislado de proteína de semilla de aceite

Referencia a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica la prioridad de conformidad con el 35 USC 119(e) de la solicitud de patente Estadounidense copendiente No. 60/288,415 presentada en mayo 4, 2001, 60/326,987 presentada en octubre 5, 2001, 60/331,066 presentada en noviembre 7, 2001, 60/333,494 presentada en noviembre 26, 2001 y _____ presentada en _____.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con métodos mejorados para la fabricación de aislados de proteínas de semilla de aceite, particularmente un aislado de proteína de canola.

10 Antecedentes de la invención

En la Patente Estadounidense Nos. 5,844,086 y 6,005,076 ("Murray II"), cedida al cesionario de esta, se describe un proceso para el aislamiento de los aislados de proteínas de la harina de semilla de aceite que tiene un contenido de grasa significativo, que incluye harina de semilla de aceite de canola que tiene tal contenido. Las etapas involucradas en este proceso incluyen solubilizar el material proteináceo de la harina de semilla de aceite, que 15 también solubiliza la grasa en la harina, y remover la grasa de la solución de proteína acuosa resultante. La solución de proteína acuosa se puede separar de la harina de semilla de aceite residual antes y después de la etapa de remoción de la grasa. La solución de proteína sin grasa se concentra después para incrementar la concentración de proteína mientras que se mantiene la resistencia iónica sustancialmente constante, después de lo cual la solución de proteína concentrada se puede someter a una etapa de remoción de grasa adicional. La solución de proteína concentrada se diluye luego para formar una masa similar a nube de moléculas de proteína altamente asociadas como gotas de proteína discreta en forma micelar. Las micelas de proteína se dejan sedimentar para formar una 20 masa de aislado de proteína similar a gluten, pegajosa, amorfa, densa, fusionada, agregada, denominada "masa de proteína micellar" o PMM, que se separa de la fase acuosa residual y se seca.

25 El aislado de proteína tiene un contenido de proteína (como se determina por Kjeldahl Nx6.25) de por lo menos aproximadamente 90% en peso, es sustancialmente no desnaturalizada (como se determina por calorimetría de barido diferencial) y tiene un contenido de grasa residual menor. El término "contenido de proteína" como se utiliza aquí se refiere a la cantidad de proteína en el aislado de proteína expresado en una base en peso seco. La producción del aislado de proteína obtenido utilizando este procedimiento, en términos de la proporción de la 30 proteína extraída de la harina de semilla de aceite que se recupera como el aislado de proteína seco es generalmente menor de 40% en peso, típicamente alrededor de 20% en peso.

35 El procedimiento descrito en la patente Murray II mencionado anteriormente se desarrolla como una modificación para el mejoramiento del procedimiento para formar un aislado de proteína de una variedad de materiales de fuente de proteína, que incluye semillas de aceite, como se describe en la Patente Estadounidense No. 4,208,323 (Murray IB). La harina de semilla de aceite disponible en 1980, cuando se presenta la Patente Estadounidense No. 4,208,323, no tiene los niveles de contaminación de grasa de las harinas de semilla de aceite de canola disponibles en el momento de las patentes Murray II, y, como una consecuencia, el procedimiento de la Patente Estadounidense No. 4,208,323 no se puede producir a partir de tales harinas de semilla de aceite de acuerdo con el proceso Murray II, los materiales proteináceos que tienen más de 90% en peso de contenido de proteína. No existe descripción de ninguno de los experimentos específicos en la Patente Estadounidense No. 4,208,303 llevada a cabo utilizando 40 harina de semilla de colza (canola) como el material de partida.

45 La Patente Estadounidense No. 4,208,323 en sí misma se diseña para que sea una mejora en el proceso descrito en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,169,090 y 4,285,862 (Murray IA) mediante la introducción de una etapa de concentración antes de dilución para formar el PMM. Las patentes Murray IA describen un experimento que involucra semilla de colza pero que no proporciona indicación de la pureza del producto. La etapa de concentración descrita en la patente Murray IB sirve para mejorar la producción del aislado de proteína de alrededor de 20% para el proceso Murray IA.

La GB-A-2077739 describe un aislado de proteína de canola que tiene un contenido de proteína de cerca de 95%.

La US-A-4266097 describe un aislado de proteína de canola que tiene un contenido de proteína de 107%.

50 Tzeng et al, Journal of Food Science, 53, 1988 Sept-Oct, Not. 5 describe un aislado de proteína de canola que tiene un contenido de proteína de 90%.

Resumen de la invención

Ahora se ha encontrado que es posible mejorar estos procesos de aislado de proteína de la técnica anterior cuando ellos se aplican a semillas de aceite, particularmente canola, para obtener producciones mejoradas del aislado de proteína seco, en términos de la proporción de la proteína extraída de las semillas de aceite, de por lo menos aproximadamente 40% en peso y frecuentemente mucho mayores, por lo menos aproximadamente 80% en peso, y los aislados de proteínas de pureza mayor, por lo menos aproximadamente 100% en peso en un índice de conversión de Nitrógeno Kjeldahl de Nx6.25.

Se ha encontrado adicionalmente que una proporción significativa de la proteína de canola extraída de la harina en el proceso de Murray IA y IB y Murray II, cuando se aplica a la harina de canola, se pierde como un resultado de descargar el sobrenadante de la etapa de formación PMM. Se proporciona aquí un mejoramiento adicional en el procedimiento anterior, que mejora la producción general de la proteína, en donde la proteína presente en el sobrenadante se recupera generalmente mediante un proceso de concentración para remover las impurezas y secar el concentrado. El producto obtenido del sobrenadante tiene generalmente un contenido de proteína (Nx6.25) de más de 100% y es un producto de aislado de proteína de canola novedoso. Tal producto novedoso proporciona un aspecto adicional de la invención.

Como un mejoramiento adicional en el procedimiento anterior, el sobrenadante concentrado se puede mezclar con el PMM y se seca la mezcla. Alternativamente, una porción del sobrenadante concentrado se puede mezclar con por lo menos una porción del PMM y la mezcla resultante se seca. Los últimos productos son productos de aislado de proteína de canola novedosos y constituyen un aspecto adicional de la invención.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar un aislado de proteína, que comprende (a) extraer una harina de semilla de aceite en una temperatura de por lo menos aproximadamente 5° y preferiblemente hasta aproximadamente 35°C para originar la solubilización de la proteína en dicha harina de semilla de aceite y para formar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 g/L y un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.8, (b) separar la solución de proteína acuosa de la harina de semilla de aceite residual, (c) incrementar la concentración de proteína de dicha solución de proteína acuosa a por lo menos aproximadamente 200 g/L mientras que se mantiene la resistencia iónica sustancialmente constante al utilizar una técnica de membrana selectiva para proporcionar una solución de proteína concentrada, (d) diluir dicha solución de proteína concentrada en agua congelada que tiene una temperatura de aproximadamente por debajo de 15°C para originar la formación de las micelas de proteína; (e) ajustar las micelas de proteína para formar una masa de proteína micelar similar a gluten gelatinoso, pegajoso, amorfó, y (f) recuperar la masa micelar de la proteína del sobrenadante que tiene un contenido de proteína de por lo menos aproximadamente 100% en peso según se determina por Nitrógeno Kjeldahl x 6.25 en una base en peso seco. Se puede secar la masa micelar de proteína recuperada. El aislado de proteína no es sustancialmente desnaturalizado (como se determina por calorimetría de barrido diferencial).

El producto de aislado de proteína en la forma de la masa de proteína micelar se describe aquí como "similar a gluten". Esta descripción que está destinada a indicar la apariencia y rasgo del aislado son similares a aquellas de gluten de trigo vital y no está destinado a indicar la identidad química para el gluten.

En una realización de este proceso, se concentra el sobrenadante de la etapa de sedimentación y el sobrenadante concentrado resultante se seca para proporcionar un aislado de proteína que tiene un contenido de proteína de por lo menos aproximadamente 90% en peso (Nx 6.25) en una base en peso seco. Tal aislado de proteína es un producto novedoso y se proporciona de acuerdo con un aspecto adicional de la invención.

En otra realización de este proceso, el sobrenadante de la etapa de sedimentación se concentra, el sobrenadante concentrado resultante se mezcla con la masa micelar de la proteína antes de secar el mismo, y la mezcla resultante se seca para proporcionar un aislado de proteína que tiene un contenido de proteína de por lo menos aproximadamente 90% en peso (Nx 6.25) en una base en peso seco. Tal aislado de proteína es un producto novedoso y se proporciona de acuerdo con otro aspecto de la invención.

En una realización adicional de la invención, se concentra el sobrenadante de la etapa resultante y solo una porción del sobrenadante concentrado resultante se mezcla con por lo menos una porción de la masa micelar de la proteína antes de secar la misma para proporcionar otros aislados de proteínas novedosas de acuerdo con la invención que tiene un contenido de proteína de por lo menos aproximadamente 90% en peso (Nx 6.25) en una base en peso seco.

Una etapa clave en el proceso de la presente invención y la capacidad de obtener producciones mayores del aislado de proteína en purezas de por lo menos 100% en peso que logradas previamente, es la concentración de la solución de proteína para un contenido de proteína de por lo menos aproximadamente 200 g/L, un valor mucho mayor que en los procedimientos descritos anteriormente. Otra etapa clave es la etapa de calentar la solución de proteína

concentrada, cuando sea necesario, antes de la dilución en agua congelada en un índice de dilución de menos de 1:15, cuando se recupera solo la masa de proteína micelar. Esta combinación específica de parámetros no se describe en la técnica anterior y tampoco se describen allí los resultados benéficos de la alta producción de proteína y la alta pureza del aislado de proteína. Una etapa adicional en mejorar la producción de la proteína, particularmente en el caso de harina de canola, es la recuperación de las cantidades adicionales de la proteína del sobrenadante de la formación de PMM y la etapa de sedimentación.

El aislado de proteína producido de acuerdo con el proceso aquí se puede utilizar en aplicaciones convencionales de los aislados de proteínas, tal como, la fortificación de la proteína de las harinas procesadas, emulsificación de aceites, formadores de cuerpo en productos horneados y agentes espumantes en los productos que atrapan gases. Adicionalmente, el aislado de proteína que se puede formar en las fibras de la proteína, útiles en análogos de carne, se pueden utilizar como un sustituto de huevo blanco o extensor en productos alimenticios en donde se utiliza huevo blanco como un ligador. El aislado de proteína de canola se puede utilizar como complemento nutricional. Otros usos del aislado de proteína de canola están en los alimentos para mascotas, alimentos para animales y en aplicaciones industriales y cosméticas y en productos para el cuidado personal.

15 Breve descripción del dibujo

La Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de un procedimiento para producir un aislado de proteína de semilla de aceite así como también otros productos de acuerdo con una realización de la invención.

Descripción general de la invención

20 La etapa inicial del proceso de esta invención involucra solubilizar el material proteináceo de la harina de semilla de aceite, particularmente harina de canola, aunque se puede aplicar el proceso a otras harinas de semilla de aceite, tal como harinas de semilla de aceite de soya, semilla de colza tradicional, lino tradicional, linola, girasol y mostaza. La invención se describe más particularmente aquí con respecto a la harina de semilla de canola.

25 El material proteináceo recuperado de la harina de semilla de canola puede ser la proteína de ocurrencia natural en la semilla de canola u otra semilla de aceite o el material proteináceo puede ser una proteína modificada mediante manipulación genética pero posee propiedades polares e hidrófobas características de la proteína natural. La harina de canola puede ser cualquier harina de canola que resulta de la remoción del aceite de canola de la semilla de aceite de canola con varios niveles de la proteína no desnaturalizada, que resulta, por ejemplo, de la extracción de hexano caliente o los métodos de extrusión de aceite frío. La remoción del aceite de canola de la semilla de aceite de canola usualmente se efectúa como una operación separada del procedimiento de recuperación del aislado de proteína de la presente invención.

30 La solubilización de la proteína se efectúa más eficientemente al utilizar una solución de sal de grado alimenticio ya que la presencia de la sal mejora la remoción de la proteína soluble de la harina de semilla de aceite. La sal de grado alimenticio usualmente es cloruro de sodio, aunque se pueden utilizar otras sales, tal como, cloruro de potasio. La solución de sal de grado alimenticio tiene una resistencia iónica de por lo menos aproximadamente 0.10, preferiblemente por lo menos aproximadamente 0.15, para permitir la solubilización de cantidades significativas de la proteína a ser efectuada. Como la resistencia iónica de la solución de sal se incrementa, el grado de solubilización de la proteína en la harina de semilla de aceite se incrementa inicialmente hasta que se alcanza un valor máximo. Cualquier incremento posterior en la resistencia iónica no incrementa la proteína solubilizada total. La resistencia iónica de la solución de sal de grado alimenticio que origina la solubilización máxima de la proteína varía dependiendo de la sal que se trate y la harina de semilla de aceite seleccionada.

35 En vista del grado mayor de dilución requerido para la precipitación de la proteína con resistencias iónicas incrementadas, se prefiere usualmente utilizar un valor de resistencia iónica menos de aproximadamente 0.8, y más preferiblemente un valor de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 0.6.

40 La solubilización de la sal de la proteína se efectúa en una temperatura de por lo menos aproximadamente 5°C, preferiblemente hasta aproximadamente 35°C, preferiblemente acompañado para agitación para reducir el tiempo de solubilización, que es usualmente aproximadamente 10 a aproximadamente 60 minutos. Se prefiere efectuar la solubilización para extraer sustancialmente la cantidad máxima de la proteína de la harina de semilla de aceite, con el fin de proporcionar una alta producción del producto general.

45 Se selecciona el límite de temperatura inferior de aproximadamente 5°C debido a que la solubilización es imprácticamente lento por debajo de esta temperatura mientras que el límite de temperatura superior preferido de aproximadamente 35°C se selecciona debido a que el proceso no llega a ser económico en niveles de temperatura mayores en un modo de tanda.

La solución de sal de grado alimenticio acuosa y la harina de semilla de aceite tienen un pH natural de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.8 para permitir al aislado de proteína ser formado por la ruta micelar, como se describe en más detalle adelante. El valor de pH óptimo para la producción máxima del aislado de proteína varía dependiendo de la harina de semilla seleccionada.

- 5 En y cerca a los límites del rango de pH, la formación del aislado de proteína ocurre solo parcialmente a través de la ruta de la micela y en producciones menores que se puede obtener en cualquier parte en el rango de pH. Por estas razones, se prefieren los valores de pH de aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.2.

El pH de la solución de sal de grado alimenticio se puede ajustar a cualquier valor deseado dentro del rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.8 para uso en la etapa de extracción mediante el uso de cualquier ácido de grado alimenticio conveniente, usualmente ácido clorhídrico, o álcali de grado alimenticio, usualmente hidróxido de sodio, cuando se requiera.

La concentración de harina de semilla de aceite en la solución de sal de grado alimenticio durante la etapa de solubilización puede variar ampliamente. Los valores de concentración típicos son aproximadamente 5 a aproximadamente 15% p/v.

- 15 La etapa de extracción de la proteína con la solución de sal acuosa tiene el efecto adicional de solubilizar las grasas que pueden estar presentes en la harina de canola, que luego resulta en las grasas que están presentes en la fase acuosa.

La solución de proteína resulta de la etapa de extracción que tiene generalmente una concentración de proteína de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 g/L, preferiblemente aproximadamente 10 a aproximadamente 25 g/L.

- 20 La fase acuosa que resulta de la etapa de extracción luego se puede separar de la harina de canola residual, en cualquier forma conveniente, tal como al emplear filtración por vacío, seguido por centrifugación y/o filtración para remover la harina residual. La harina residual separada se puede secar para desecho.

25 El color del aislado de proteína de canola final se puede mejorar en términos de color de luz y amarillo menos intenso mediante la mezcla de carbón activado en polvo u otro agente de adsorción del pigmento con la solución de proteína acuosa separada y posteriormente remover el adsorbente, convenientemente mediante filtración, para proporcionar una solución de la proteína. La diafiltración de la solución de proteína acuosa separada también se puede utilizar para la remoción del pigmento.

30 Tal etapa de remoción del pigmento se puede llevar a cabo bajo cualesquier condiciones convenientes, generalmente en la temperatura ambiente de la solución de proteína acuosa separada, empleando cualquier agente de adsorción del pigmento adecuado. Para el carbón activado en polvo, se emplea una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% p/v, preferiblemente aproximadamente 0.05% a aproximadamente 2% p/v.

35 En donde la harina de semilla de canola contiene cantidades significativas de grasa, como se describe en las patentes Murray II, entonces las etapas de desengrasado descritas aquí se puede efectuar en la solución de proteína acuosa separada y en la solución de proteína acuosa concentrada. Cuando se lleva a cabo la etapa de mejoramiento del color, tal etapa se puede efectuar después de la primera etapa de desengrasado.

40 Como una alternativa para extraer la harina de semilla de aceite con una solución de sal de grado alimenticio acuosa, se puede hacer tal extracción utilizando solo agua, aunque la utilización de solo agua tiende a extraer menos proteína de la harina de semilla de aceite que la solución de sal de grado alimenticio acuosa. En donde se emplea tal alternativa, luego la sal de grado alimenticio, en las concentraciones discutidas anteriormente, se puede agregar a la solución de proteína después de la separación de la harina de semilla de aceite residual con el fin de mantener la proteína en la solución durante la etapa de concentración descrita adelante. Cuando se lleva a cabo una etapa de remoción de color y/o una primera etapa de remoción de grasa, la sal de grado alimenticio generalmente se agrega luego de la terminación de tales operaciones.

45 Otro procedimiento alternativo es para extraer la harina de semilla de aceite con la solución de sal de grado alimenticio en un valor de pH relativamente alto aproximadamente 6.8, generalmente hasta aproximadamente 9.8. El pH de la solución de sal de grado alimenticio, se puede ajustar en pH al valor alcalino mediante el uso de cualquier álcali de grado alimenticio conveniente, tal como solución de hidróxido de sodio acuosa. En donde se emplea tal alternativa, la fase acuosa resulta de la etapa de extracción de harina de semilla de aceite que luego se separa de la harina de canola residual, en cualquier forma conveniente, tal como al emplear filtración por vacío, seguido por centrifugación y/o filtración para remover la harina residual. La harina residual separada se puede secar para desecho.

La solución de proteína acuosa resulta de la etapa de extracción de pH alto que luego es pH ajustado al rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.8, preferiblemente aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.2, como se discutió anteriormente, antes de procesamiento adicional como se discute adelante. Tal ajuste de pH se puede efectuar utilizando cualquier ácido de grado alimenticio conveniente, tal como ácido clorhídrico.

- 5 La solución de proteína acuosa luego se concentra para incrementar la concentración de proteína de la misma mientras que se mantiene la resistencia iónica de la misma sustancialmente constante. Tal concentración se efectúa para proporcionar una solución de proteína concentrada que tiene una concentración de proteína de por lo menos aproximadamente 200 g/L, preferiblemente por lo menos aproximadamente 250 g/L.
- 10 La etapa de concentración se puede efectuar mediante cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas, tal como membranas de fibra hueca o membranas en espiral, con un corte de peso molecular adecuado, tal como aproximadamente 3000 a aproximadamente 50,000 daltons, con respecto a diferentes materiales y configuraciones de membrana.
- 15 La etapa de concentración se puede efectuar en cualquier temperatura conveniente, generalmente aproximadamente 20° C a aproximadamente 60°C, y durante un periodo para efectuar el grado deseado de concentración. La temperatura y otras condiciones utilizadas para algún grado dependen del equipo de membrana utilizado para efectuar la concentración y la concentración de proteína deseada de la solución.
- 20 La concentración de la solución de proteína en una concentración por encima de aproximadamente 200 g/L en esta etapa, significativamente entre los niveles previamente contemplados y lograda cuando se emplean los procesos Murray I y Murray II, no solo incrementa la producción del proceso a niveles por encima de aproximadamente 40% en peso en términos de la proporción de la proteína extraída que se recupera como el aislado de proteína seco, preferiblemente por encima de aproximadamente 80% en peso, pero también reduce la concentración de sal del aislado de proteína final después del secado. La capacidad de controlar la concentración de sal del aislado es importante en aplicaciones del aislado en donde las variaciones en las concentraciones de sal afectan las propiedades funcionales y sensoras en una aplicación alimenticia específica.
- 25 Como es bien conocido, la ultrafiltración y las técnicas de membrana selectiva similares permiten a las especies de bajo peso molecular pasar a su través mientras se evita las especies de mayor peso molecular lo hagan. Las especies de bajo peso molecular incluyen no solo las especies iónicas de la sal de grado alimenticio sino también los materiales de bajo peso molecular extraídos del material de fuente, tal como, carbohidratos, péptidos, pigmentos y factores anti-nutricionales, así como también cualesquier formas de bajo peso molecular de la proteína. El corte de peso molecular de la membrana se selecciona usualmente para asegurar la retención de una proporción significativa de la proteína en la solución, mientras se permite que los contaminantes pasen con respecto a los diferentes materiales y configuraciones de membrana.
- 30 Dependiendo de la temperatura empleada en la etapa de concentración, la solución de proteína concentrada se puede calentar a una temperatura de por lo menos aproximadamente 20°C, y hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente aproximadamente 25°C a aproximadamente 40°C, para reducir la viscosidad de la solución de proteína concentrada para facilitar el desarrollo de la etapa de dilución posterior y la formación de micela. La solución de proteína concentrada no se debe calentar entre una temperatura por encima de la cual la temperatura de la solución de proteína concentrada no permite la formación de micela en dilución mediante agua congelada. La solución de proteína concentrada se puede someter a una operación de desengrasado adicional, si se requiere, como se describe en Murray II.
- 35 La solución de proteína concentrada resulta de la etapa de concentración y la etapa de desengrasado opcional se diluye para efectuar la formación de micela al agregar la solución de proteína concentrada en un cuerpo de agua que tiene el volumen requerido para alcanzar el grado de dilución deseado. Dependiendo de la proporción de la proteína de canola deseada que se va a obtener mediante la ruta de micela y la proporción del sobrenadante, se puede variar el grado de dilución de la solución de proteína concentrada. Con niveles de dilución mayores, en general, una proporción mayor de la proteína de canola permanece en la fase acuosa.
- 40 Cuando se desea suministrar la proporción mayor de la proteína mediante la ruta de micela, la solución de proteína concentrada se diluye mediante aproximadamente 15 veces o menos, preferiblemente aproximadamente 10 veces o menos.
- 45 50 El cuerpo de agua en el cual se carga la solución de proteína concentrada tiene una temperatura de menos de aproximadamente 15°C, generalmente aproximadamente 3° C a aproximadamente 15°C, preferiblemente menos de aproximadamente 10°C, ya que se mejoran las producciones del aislado de proteína en la forma de la masa de proteína micelar que se obtienen con estas temperaturas frías en los factores de dilución utilizados.

- La dilución de la solución de proteína concentrada y la reducción consecuencial en la resistencia iónica originan la formación de una masa similar a nube de las moléculas de proteína altamente asociadas en la forma de gotas de proteína discreta en forma micelar. A las micelas de proteína se les deja sedimentarse para formar una masa de proteína micelar similar a gluten pegajosa, amorfía, densa, fusionada, agregada. La sedimentación puede ser asistida, tal como mediante centrifugación. Tal ajuste inducido reduce el contenido de líquido de la masa micelar de la proteína, reduciendo por lo tanto el contenido de humedad generalmente de aproximadamente 70% en peso a aproximadamente 95% en peso en un valor de generalmente aproximadamente 50% en peso a aproximadamente 80% en peso de la masa micelar total. Reducir el contenido de humedad de la masa micelar en esta forma también reduce el contenido de sal ocluido de la masa micelar, y por lo tanto el contenido de sal del aislado seco.
- 10 La combinación de los parámetros del proceso para la concentración de la solución de proteína en un contenido de proteína de por lo menos aproximadamente 200 g/L y el uso de un factor de dilución de menos de aproximadamente 15, resulta en producciones mayores, frecuentemente significativamente producciones mayores, en términos de la recuperación de la proteína en la forma de la masa micelar de la proteína del extracto de harina original, y aislados mucho más puros en términos del contenido de la proteína que se alcanzan utilizando cualquiera de los procedimientos de la técnica anterior (Murray IA, IB y II) referidos anteriormente.
- 15 El aislado sedimentado, en la forma de una masa de proteína similar a gluten, gelatinosa, pegajosa, agregada, amorfía, denominada "masa de proteína micelar", o PMM, se separa de la fase acuosa residual o el sobrenadante, tal como mediante decantación de la fase acuosa residual de la masa sedimentada o mediante centrifugación. El PMM se puede utilizar en forma húmeda o se puede secar, mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por rociado, secado por congelamiento o secado por tambor de vacío, en una forma seca. El PMM seco tiene un alto contenido de proteína, en exceso de aproximadamente 100% en peso de la proteína (calculado como Kjeldahl Nx6.25), y es sustancialmente no desnaturalizado (como se determina por calorimetría de barrido diferencial). El PMM seco aislado de la harina de semilla de aceite también tiene un contenido de grasa residual bajo, cuando se emplea el procedimiento de Murray II, que puede estar por debajo de aproximadamente 1% en peso.
- 20 25 De acuerdo con un aspecto de la invención, particularmente cuando este se aplica a la proteína de canola, se ha encontrado ahora que el sobrenadante de la formación de PMM y la etapa de sedimentación contienen cantidades significativas de proteína de canola, que no se precipita en la etapa de dilución. No se ha propuesto previamente, en las patentes Murray IA, IB y II, intentar recuperar la proteína adicional del sobrenadante y no se hace observación en esta técnica anterior en cuanto a cualquier contenido de proteína potencial del sobrenadante. De acuerdo con este aspecto de la invención, se realizan las etapas para recuperar la proteína de canola del sobrenadante.
- 30 En tal procedimiento, el sobrenadante de la etapa de dilución, luego de la remoción del PMM, se puede concentrar para incrementar la concentración de proteína del mismo. Tal concentración se efectúa utilizando cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración, utilizando membranas con un corte de peso molecular adecuado que permite especies de bajo peso molecular, incluyendo la sal de grado alimenticio y otros materiales de bajo peso molecular no proteináceo extraídos del material de fuente, para pasar a través de la membrana, mientras se retiene la proteína de canola en la solución. Se pueden utilizar las membranas de ultrafiltración que tienen un corte de peso molecular de aproximadamente 3000 a 10,000 daltons con respecto a diferentes membranas y configuraciones. La concentración del sobrenadante en esta forma también reduce el volumen del líquido requerido para ser secado para recuperar la proteína, y por lo tanto la energía requerida para el secado. El sobrenadante generalmente se concentra en un contenido de proteína de aproximadamente 100 a 400 g/L, preferiblemente aproximadamente 200 a aproximadamente 300 g/L, antes del secado.
- 35 40 45 50 El sobrenadante concentrado se puede secar mediante cualquier técnica conveniente, tal como secado por rociado, secado por congelamiento o secado en tambor de vacío, en una forma seca para proporcionar un aislado de proteína adicional de canola. Tal aislado de proteína adicional de canola tiene un alto contenido de proteína, usualmente en exceso de aproximadamente 90% en peso de la proteína (calculado como Kjeldahl Nx6.25) y es sustancialmente desnaturalizado (como se determina por calorimetría de barrido diferencial). Si se desea, el PMM húmedo se puede combinar con el sobrenadante concentrado antes de secar las corrientes de proteína combinadas mediante cualquier técnica conveniente para proporcionar un aislado de proteína combinado de canola. El aislado de proteína combinado de canola tiene un alto contenido de proteína, en exceso de aproximadamente 90% en peso (calculado como Kjeldahl Nx6.25) y es sustancialmente no desnaturalizado (como se determina por calorimetría de barrido diferencial).
- 55 En otro procedimiento alternativo, solo una porción del sobrenadante concentrado se puede mezclar con por lo menos parte del PMM y la mezcla resultante se seca. El resto del sobrenadante concentrado se puede secar como cualquiera del resto del PMM. Adicionalmente, el PMM seco y el sobrenadante seco también se pueden mezclar seco en cualesquier proporciones relativas deseadas.
- Al operar en esta forma, se puede recuperar un número de los aislados de proteínas de canola, en la forma de PMM seco, el sobrenadante seco y las mezclas secas de varias proporciones en peso de PMM y el sobrenadante,

generalmente de aproximadamente 5:95 a aproximadamente 95:5 en peso, pueden ser deseables para lograr las diferentes propiedades nutricionales y funcionales.

- Como una alternativa para la dilución de la solución de proteína concentrada en agua congelada y el procesamiento del precipitado resultante y el sobrenadante como se describió anteriormente, la proteína se puede recuperar de la solución de proteína concentrada al dializar la solución de proteína concentrada para reducir su contenido de sal. La reducción del contenido de sal de la solución de proteína concentrada resulta en la formación de las micelas de proteína en el tubo de diálisis. Luego de la diálisis, las micelas de proteína se pueden dejar para sedimentación, recolección y secado, como se discutió anteriormente. El sobrenadante de la etapa de sedimentación de micela de proteína se puede procesar, como se discutió anteriormente, para recuperar la proteína adicional del mismo. Alternativamente, los contenidos del tubo de diálisis se pueden secar directamente. El último procedimiento alternativo es útil en donde se desean cantidades de laboratorio de escala pequeña de la proteína.

Descripción de la realización preferida

- Con referencia a la Figura 1, se ilustra esquemáticamente una lámina de flujo de una realización para la invención. La harina de semilla de aceite de canola y el medio de extracción acuoso se cargan mediante una línea 10 en un recipiente de extracción 12 en donde la harina de semilla de aceite se extrae y se forma una solución de proteína acuosa. La suspensión de la solución acuosa de proteína y la harina de semilla de aceite residual se pasa por la línea 14 en una campana de filtro de vacío 16 para la separación de la harina de semilla de aceite residual que se remueve por la línea 18. La solución de proteína acuosa se pasa después por la línea 20 en una operación de clarificación 22 en donde la solución de proteína acuosa se centrifuga y se filtra para remover partículas finas, que se recuperan por la línea 24.

La solución de proteína acuosa clarificada se bombea por la línea 26 a través de la membrana de ultrafiltración 28 para producir una solución de proteína concentrada como el retenido en la línea 30 con el permeado que se recupera por la línea 32. La solución de proteína concentrada se pasa en un recipiente de precipitación 34 que contiene agua fría cargada por la línea 36. La masa micelar de proteína formada en el recipiente de precipitación 34 se remueve por la línea 38 y se pasa a través de un secador por rociado 40 para proporcionar la proteína seca aislada de canola 42.

El sobrenadante del recipiente de precipitación 34 se remueve por la línea 44 y se bombea a través de las membranas de ultrafiltración 46 para producir una solución de proteína concentrada como el retenido en la línea 48 con el permeado que se remueve por la línea 50. La solución de proteína concentrada se pasa a través de un secador por rociado 52 para proporcionar el aislado de proteína seco adicional de canola 54.

Como una alternativa, la solución de proteína concentrada en la línea 48 se puede pasar por la línea 56 para mezclar con la masa micelar de la proteína antes de la mezcla que luego se seca en el secador por rociado 40.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

- Este Ejemplo ilustra el proceso de la invención.

Se agrega 'a' kg de harina de canola comercial a 'b' L de 0.15 M de solución de NaCl a temperatura ambiente y se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 'c' g/L. La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación para producir 'd' L de una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de 'e' g/L.

La solución de extracto de proteína o una alícuota 'f' L de la solución de extracto de proteína se reduce en volumen a 'g' L mediante concentración en un sistema de ultrafiltración utilizando 'h' las membranas de corte de peso molecular en dalton. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 'i' g/L.

La solución concentrada a 'j' °C se diluye 'k' en agua a 4° C. Una nube blanca de las micelas de proteína formadas inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y la masa pegajosa, viscosa, precipitada (PMM) se recupera del fondo del recipiente en una producción de 'l' % en peso de la proteína extraída y se seca. Se encuentra que la proteína seca tiene un contenido de proteína de 'm' % en peso (Nx 6.25) d.b. El producto se da en la designación 'n'. Los parámetros 'a' a 'n' se bosquejan en la siguiente Tabla I:

TABLA I

n	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
CPIA06-13	300	2500	13.0	1160	10.5	(1)	13	30000	303	(2)	01:10	(2)	106.5
BW-AH12-G16-01	225	1500	19.6	(2)	17.5	600	30	3000	245	30	01:15	(2)	104.1
BW-AL016-K15-01(3)	1200	8000	14.9	(2)	10.4	400	40	10000	257	30	01:15	46	106.9
CPI-A06-33	300	2000	10.8	1800	8.7	(1)	55	30000	217	(2)	01:10	(2)	104.3
A11-04	300	2000	23.2	1772	21.7	1000	52	30000	240	34	01:15	(2)	107.2

Notas:

- (1) Se concentra toda la solución de extracto de proteína
- (2) No determinado
- (3) El retentato concentrado se diafiltrá con 6 volúmenes de 0.15 M NaCl mientras se mantiene el volumen en 40L antes de dilución

Ejemplo 2:

El proceso del Ejemplo 1 se repite con las condiciones del procedimiento a ser variadas. Se estudian un número de parámetros.

5

(a) Parámetros de extracción:

Los parámetros de extracción varían para lograr su efecto en la concentración de la solución de proteína obtenida. Los resultados se tabulan en la siguiente Tabla II:

TABLA II

Concentración de extracción	Temperatura de extracción	Tiempo de extracción	Concentración de solución NaCl	pH de solución de extracción	Concentración de la proteína
5% p/v	13° C	30 min	0.15 M	6.4	5. 3 g/L
15% p/v	13° C	30 min	0.15 M	6.2	12.7 g /L
15% p/v	8° C	30 min	0.15 M	-	6.6 g/L
15% p/v	34° C	30 min	0.15 M	-	14.6 g/L
15% p/v	22° C	10 min	0.15 M	5.9	10.5 g/L
15% p/v	13° C	60 min	0.15 M	5.9	10.6 g/L
10% p/v	15° C	30 min	0.15 M	-	9.7 g/L
10% p/v	13° C	70 min	0.15 M	-	9.3 g/L
10% p/v	13° C	30 min	0.15 M	5.3	9.8 g/L
10% p/v	13° C	30 min	0.15 M	6.2	10.6g/L

(b) Parámetros de dilución:

Los parámetros de dilución varían para lograr su efecto en la producción de PMM de la etapa de dilución. Los resultados se tabulan en la siguiente Tabla III:

TABLA III

Concentración de proteína	Temperatura del Agua de Dilución	Relación de dilución	Recuperación de PMM
206 g/L	4º C	1:10	51.7%
258 g/L	4º C	1:10	61.8%
283 g/L	4º C	1:10	42.6%
230 g/L	15º C	1:10	4.5%
249 g/L	4º C	1:5	40.4%
249 g/L	4º C	1:3	30.7%

5

Ejemplo 3:

Este Ejemplo ilustra el efecto de la temperatura del agua de dilución en la producción del producto de aislado de proteína.

Se agrega 1200 kg de harina de canola comercial a 8000 L de 0.15 M de solución de NaCl a temperatura ambiente y se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 17.4 g/L. La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación para producir 7464 L de una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de 14.8 g/L.

La solución de extracto de proteína se reduce en volumen mediante concentración en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de 3,000 dalton. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 230 g/L.

Una alícuota de 50 ml de la solución concentrada se calienta a 30º C luego se diluye 1:10 en 15º C de agua de grifo. Se forma una nube blanca leve de micelas muy pequeñas y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve dejando una cantidad muy pequeña de precipitado. El precipitado solo representa 4.5% en peso de la proteína en la alícuota de 50 ml de la solución concentrada en lugar de una recuperación típica de 50% en peso cuando se diluye en 4º C de agua de grifo. La alícuota de 50 ml se toma de la tanda con la designación BW-AH012-HI4-01A. Los datos de este Ejemplo también se presentan en la Tabla III anterior con respecto a la relación de dilución.

Ejemplo 4:

Este Ejemplo muestra el efecto de la temperatura de la solución concentrada en la producción de dilución.

Se agrega 1200 kg de la harina de semilla de aceite de canola comercial a 8000 L de 0.15 M de solución de NaCl a temperatura ambiente y se agita durante 30 minutos a 13º C para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 'a' g/L. La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación para producir una solución clarificada que tiene un contenido de proteína de 'b' g/L.

La solución clarificada de proteína o una alícuota 'c' de la solución de extracto de proteína se reduce en volumen a 'd' L en un sistema de ultrafiltración utilizando una membrana de corte de peso molecular de dalton 'e'. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 'f' g/L. Se da la designación 'g' a los lotes.

Los parámetros 'a' a 'g' se dan en la siguiente Tabla IV:

TABLA IV

g	BW-AL011-J16-01A	BW-AL017-D11-02A
a	24.4	26.3
b	20.3	18.0
c	(1)	2000
d		152
e	3000	5000
f	287	285.9

Nota:

(1) Se concentra toda la solución de extracto de proteína.

5 Se calientan 50 ml de alícuotas retenidas de lote BW-AL011-J16-01A a 30º C y 60º C antes de ser diluido 1:10 en agua a 4º C. En cada caso, una nube blanca de las micelas de proteína se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y la masa pegajosa, viscosa, precipitada (PMM) se seca. El PMM se recupera de cada experimento y se calcula la producción de la etapa de dilución. En el caso que la temperatura del retenido sea 30º C, la recuperación de la proteína es 57.1% en peso, aunque para 60º C, la producción es 23.7% en peso.

10 Se calientan 5 ml de las alícuotas del retenido de lote BW-AL017 D11-02A en varias temperaturas entre 30º C y 60º C y luego se diluye en relación de dilución de 1:10 o 1:15 en agua a 4º C. En cada caso, una nube blanca de las micelas de proteína se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y la masa pegajosa, viscosa, precipitada (PMM) se seca. El PMM se recupera de cada experimento y se calcula la producción de la etapa de dilución. Los resultados obtenidos aparecen en la siguiente Tabla V:

TABLA V

Temperatura del retenido	Relación de dilución	Producción de PMM
30º C	1:10	49%
40º C	1:10	49
50º C	1:10	47
60º C	1:10	35
30º C	1:15	51
40º C	1:15	51
50º C	1:15	39
60º C	1:15	39

15

Como se puede ver a partir de esta Tabla, se obtienen producciones mayores en temperaturas moderadamente elevadas mientras que mayores temperaturas elevadas tienden a reducir las producciones.

Ejemplo 5:

20 Este Ejemplo ilustra la preparación de las proteínas adicionales aisladas de canola utilizando varias combinaciones de parámetros e incluyendo adicionalmente tratamiento con carbón activado en polvo.

5 Se agrega 'a' kg de harina de canola comercial a 'b' L de 0.15 M de solución de NaCl a temperatura ambiente y se agita 'c' minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 'd' g/L. La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación para producir una solución clarificada de proteína que tiene un contenido de proteína de 'e' g/L.

Se agrega 'f%' en peso carbón activado en polvo (PAC) a la solución clarificada. La suspensión se mezcla durante 15 minutos, luego de lo cual el PAC se remueve mediante filtración, lo que resulta en 'g' L de un extracto 'h' g/L.

10 Una alícuota 'i' L de la solución de extracto de proteína de la etapa de tratamiento PAC se reduce en volumen en 'j' L en un sistema de ultrafiltración utilizando un membrana de corte de peso molecular de 30,000. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 'k' g/L.

15 La solución concentrada a 'l' ° C se diluye 1: 'm' en 4° C de agua de grifo. Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y la masa pegajosa, viscosa, precipitada se seca. La proteína seca que se forma tiene un contenido de proteína de 'n%' en peso de la proteína (Nx5.25 d.b.). La recuperación de proteína general es decir el promedio del aislado de proteína seco expresado como un porcentaje de la proteína solubilizada en la etapa de extracción, es 'o%' en peso. El producto se da en la designación CPI 'p'.

Los parámetros de especificación "a" a "p" para estas diferentes muestras del producto de proteína se establecen en la siguiente Tabla VI:

TABLA VI

p	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
A07-15	150	1000	30	14.0	13.1	2	700	8.9	460	21	246	30	10	103.5	44
A07-22	150	1000	120	13.0	12.3	4	800	8.2	800	9	490	20	5	106.9	(1)
A08-02	300	2000	300	14.0	14.5	0.06	1300	13.8	480	6	421	25	5	105.8	(1)
A10-13	300	2000	45	28.6	24.9	1	2150	22.7	1000	80	176	20	10	109.2	(1)

Nota: (1) no se determina.

El efecto de la adición del carbón activado en polvo sobre el color del aislado de proteína de canola se muestra en el Ejemplo 7 adelante.

Ejemplo Comparativo 6:

Aquí se utiliza agua en la etapa de extracción y se agrega posteriormente sal.

- 5 Se agrega 150 kg de canola comercial a 1000 L de agua a 13º C, se agita durante 30 minutos lo que resulta en una solución de proteína con una concentración de 4.5 g/L. La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína acuosa se clarifica mediante centrifugación produciendo 1100 L de un extracto 3.8 g/L.

- 10 Se prerrecubre carbón activado en polvo (PAC) en almohadillas de filtro antes que se filtre la solución clarificada produciendo 1000 L de un extracto 3.2 g/L.

Se agrega cloruro de sodio a la última solución de proteína en una concentración de 0.15M. El volumen de la solución de proteína se reduce a 10 L en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de 30,000 dalton. La solución concentrada tiene un contenido de proteína de 292 g/L. Una alícuota de la solución de proteína concentrada se calienta a 30º C, antes de dilución 1:3 en agua a 4º C.

- 15 Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y la masa pegajosa, viscosa, precipitada (PMM) se seca. El aislado de proteína de canola seco, que da la identificación CPI A07-18, tiene un contenido de proteína de 96% en peso de la proteína (Nx6.25). La recuperación de la proteína es 59% en peso de la proteína originalmente extraída.

Ejemplo 7:

- 20 Este Ejemplo proporciona una comparación del color de ciertos aislados de proteínas de canola producidas aquí en comparación con huevo blanco secado por rociado, aislado de proteína de soya convencional y los productos producidos de acuerdo con Murray II.

- 25 Se evalúan las muestras del aislado de proteína para claridad (L) y cromaticidad (a y b) utilizando un colorímetro Minolta. En el espacio de color L a b, el valor se mueve de 0 a 100, con 100 que es blanca y 0 que es negro. La cromaticidad coordina, a y b, ambos tienen valores máximos de + 60 y -60, +a que es la dirección roja, -a que es la dirección verde, +b que es la dirección amarilla y -b que es la dirección azul.

La siguiente Tabla VII establece los resultados obtenidos:

TABLA VII

Muestra	L	a	b	comentarios
Huevo blanco	90.34	-2.73	21.43	
Aislado de proteína de soya	85.10	-0.906	14.67	Los valores a y b no son cercanos al huevo blanco como CPI tratado con PAC
CPI A07-15 (Ejemplo 5)	82.77	-2.13	22.98	Extracción de NaCl con (2%) PAC alto
CPI A07-18 (Ejemplo 6)	82.80	-2.69	25.19	Extracción de agua con PAC
CPI A06-33 (Ejemplo 1)	75.60	0.404	26.51	Extracción NaCl sin PAC
CPI A08-02 (Ejemplo 5)	80.04	-2.87	23.37	Extracción NaCl con (0.06%) PAC bajo
Murray II	65.81	0.962	18.27	Producto relativamente oscuro

Los resultados establecidos en la Tabla VII muestran el efecto benéfico de color, a saber más blanco, menos amarillo, mediante el uso de carbón activado en polvo.

Ejemplo 8:

Este Ejemplo ilustra la preparación de aislado de proteína de canola adicional que incluye la proteína recuperada del sobrenadante.

Se agrega 'a' kg de harina de canola comercial a 'b' L de 0.15 M de solución de NaCl a temperatura ambiente y se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 'c' g/L. La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación para producir una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de 'd' g/L seguido mediante la adición de 1% en peso de carbón activado en polvo (PAC).

La suspensión se mezcla durante 15 minutos, luego de lo cual el PAC se remueve mediante filtración, lo que resulta en 'e' L de un extracto 'f' g/L.

Una alícuota 'g' L de la solución de extracto de proteína de la etapa de tratamiento PAC se reduce en volumen a 'h' L en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 30,000 dalton. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 'i' g/L.

La solución concentrada a 'j' °C se diluye 1: 'k' en agua a 4° C. Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y se reduce en volumen mediante ultrafiltración utilizando 3000 las membranas de corte de peso molecular en dalton mediante un factor de reducción de volumen de 'l'. El concentrado se agrega a la masa pegajosa, viscosa, precipitada y la mezcla se seca. La mezcla de proteína seca que se forma tiene un contenido de proteína de 'm%' en peso de la proteína ($N \times 6.25$). El producto se da en la designación CPI 'n'.

Los parámetros específicos 'a' a 'n' para dos diferentes muestras del producto de proteína se establecen en la siguiente Tabla VIII:

TABLA VIII

n	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
A10-04	300	2000	28.4	27.6	1330	16.3	200	18	186	28	10	11	100.3
A10-05	300	2000	27.7	21.9	1320	21.9	300	20	267	27	15	21	102.3

25

Ejemplo 9:

Este Ejemplo ilustra adicionalmente la preparación de aislado de proteína de canola adicional que incluye la proteína recuperada del sobrenadante sin tratamiento de PAC.

Se agrega 'a' kg de harina de canola a 'b' L de 0.15 M de solución de NaCl en una temperatura de 20° C y se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 'c' g/L. La harina de canola resultante se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación y filtración para producir una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de 'd' g/L.

La solución de extracto de proteína o una alícuota 'e' L de la solución de extracto de proteína se reduce en volumen en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas que tiene un corte de peso molecular de 'f' daltons. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 'g' g/L.

La solución concentrada a 'h' °C se diluye 'i' en agua 'j' °C. Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y se concentra mediante ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 3000 dalton para proporcionar un sobrenadante concentrado que tiene un contenido de proteína de 'k' g/L. El concentrado se agrega a la masa pegajosa, viscosa, precipitada y la mezcla se seca.

La mezcla de proteína seca se encuentra que tiene un contenido de proteína de '1%' en peso ($N \times 6.25$). La producción del aislado de proteína de canola del extracto de solución de proteína es 'm%' en peso. El producto se da en la designación 'n'.

Los parámetros específicos 'a' a 'n' para dos muestras diferentes del producto de proteína se establecen en la siguiente Tabla IX:

TABLA IX

n	BW-AL11-I21-01A	A11-01
a	1200	300
b	8000	2000
c	24.5	23.7
d	17.8	20.7
e	(1)	400
f	3000	30,000
g	284.7	200.2
h	31	32
i	1:10	1:15
j	8	4
k	279.0	104.7
l	00.2	102.8
m	68.1	(2)
Nota: (1) Toda la solución de extracto de proteína se concentra		
(2) no se determina		

Ejemplo 10:

Este Ejemplo ilustra la extracción de la proteína de harina de canola en un pH relativamente alto y la recuperación de la proteína del sobrenadante.

Se agrega 150 kg de harina de canola comercial a 2000 L de 0.15 M de NaCl que tiene un pH ajustado a 9.5 mediante la adición de hidróxido de sodio a temperatura ambiente, se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 13.2 g/L. La harina de canola residual se clarifica mediante centrifugación y filtración para producir 1210 L de una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de 12.1 g/L.

El pH de la solución clarificada de proteína se ajusta a 6.2 mediante la adición de ácido clorhídrico. Una alícuota de 900 L de la solución de extracto de proteína se reduce en volumen a 50 L mediante concentración en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 3000 dalton. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 276.2 g/L.

La solución concentrada a 30 ° C se diluye en agua a 4° C. Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y 390 L de este sobrenadante se concentra por 24 L mediante ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 3000 dalton para proporcionar un sobrenadante

concentrado que tiene un contenido de proteína de 149.0 g/L. El concentrado se agrega a la masa pegajosa, viscosa, precipitada y la mezcla se seca.

- 5 La mezcla de proteína seca se encuentra que tiene un contenido de proteína de 103.3% en peso (Nx 6.25). La producción del aislado de proteína de canola del extracto de solución de proteína es 48.3% en peso. El producto se da en la designación BW-AL017-D08-02A.

Ejemplo 11:

Este Ejemplo ilustra la preparación del aislado de proteína de canola mediante el procesamiento del sobrenadante.

- 10 Se agrega 'a' kg de canola comercial a 'b' L de 0.15 M de solución de NaCl a temperatura ambiente y se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 'c' g/L.
 La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación para producir una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de 'd' g/L.

- 15 La solución clarificada de proteína se reduce en volumen en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 3,000 dalton. La solución concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 'e' g/L.

La solución concentrada a 'f' ° C se diluye 'g' en agua a 4° C. Una nube blanca formada inmediatamente y se les deja sedimentarse. El agua diluida superior se remueve y la masa pegajosa, viscosa, precipitada (PMM) se recupera del fondo del recipiente y se seca. Se encuentra que la proteína seca tiene contenido de proteína de 'k%' en peso (Nx6.25) d.b.

- 20 20 El agua de dilución superior removida se reduce en volumen mediante ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 3,000 dalton en una concentración de proteína de 'i' g/L. Después se seca el concentrado. La proteína seca que se forma tiene un contenido de proteína de 'j%' en peso (Nx6.25). El producto se da en la designación 'l'.

- 25 Los parámetros específicos 'a' a 'l' para dos muestras diferentes del producto de proteína se establecen en la siguiente Tabla X:

TABLA X

1	AL016-J24	AL011-J16-01A
a	1200	1200
b	8000	8000
c	22.7	24.4
d	16.9	20.3
e	281	287
f	37	28
g	1:10	1:10
h	(2)	101.9
i	(3)	265
j	103.9	101.5
k	(2)	101.6
Nota:		
(1) Se concentra toda la solución de extracto de		

proteína
(2) No se determina
(3) El sobrenadante se concentra mediante un factor de reducción de volumen de 16.

Ejemplo 12:

Este Ejemplo ilustra la aplicación del proceso de la invención para enfriar la harina de canola presionado y la recuperación de la proteína adicional del sobrenadante.

5 Se comprime 50 kg de harina de canola y se recupera 13 L de aceite. Se agrega 30 kg de la harina triturado resultante a 300 L de 0.15M de solución de NaCl a 20° C y la mezcla se agita durante 40 minutos, seguido por un periodo de ajuste de treinta minutos. Se obtienen 200 L de la solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 19.5 mg/ml.

10 La solución de proteína acuosa se enfría a 4° C y se refrigerara en aquella temperatura durante 16 horas, para permitir la grasa presente en la harina y se extrae en la etapa de extracción, para separación, de acuerdo con el procedimiento de Murray II. La capa de grasa resultante se remueve de la superficie de la solución de proteína acuosa. La solución de proteína acuosa restante se filtra a través de una prensa de filtro que tiene una almohadilla de filtro de 20 µm para remover las partículas restantes del casco y el material de la pared celular así como también partículas residuales de grasa. Se obtienen 200 L del filtrado con un contenido de proteína de 14.6 mg/ml.

15 La solución de proteína acuosa se reduce en volumen a 10.5 L mediante concentración en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 10,000 dalton. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 200 g/L, que representa una producción de 67% en peso de la proteína originalmente extraída de la harina de canola. La solución resultante de 10.5 L se congela de nuevo a 4° C y se refrigerara en esta temperatura durante 16 horas. La solución luego se centrifuga a 10,000 x g durante cinco minutos y la grasa separada removida de la solución de proteína concentrada.

20 La solución de proteína se calienta a 30° C y se agrega al agua a 4° C en una relación de dilución de 1:9. Luego de ajuste durante la noche, se decanta 85 L del sobrenadante que deja aproximadamente 9 L de la masa precipitada, viscosa, pegajosa (PMM). El PMM se concentra adicionalmente mediante centrifugación a 10,000 x g durante 5 minutos y una alícuota del PMM centrifugado se congela seco para determinar su contenido de proteína. El PMM seco congelado se encuentra que tiene un contenido de proteína de 105.5% en peso (Nx6.25).

25 El sobrenadante de la etapa de formación PMM se concentra a 11L mediante concentración en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de 10,000 de dalton. Esta última solución concentrada tiene una concentración de proteína de 89.7 mg/ml. Una alícuota de esta solución concentrada se seca por congelamiento para determinar el contenido de proteína. La proteína seca por congelamiento se encuentra que tiene un contenido de proteína de 101.7% en peso (Nx6.25).

30 La producción general de la proteína como PMM y se recupera del sobrenadante de la proteína extraída de la harina de canola es 50% en peso.

Ejemplo 13:

Este Ejemplo ilustra la aplicación del proceso de la invención para semilla de col rica en ácido erúcico.

35 Se agrega 35 kg de harina de semilla de col rica en ácido erúcico comercial a 350 L de 0.3 M de solución de NaCl (10% p/v) a 15° C y se agita durante una hora para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 7.71 g/L. Una segunda corrida bajo las mismas condiciones produce una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 7.36 g/L. Las soluciones de extracto se decantan y se clarifican mediante filtración a través de almohadillas de filtro de 20 µm para remover la harina residual y para proporcionar un volumen de filtrado total de 550 L.

40 El filtrado luego se concentra a 9 L utilizando un sistema de ultrafiltración de fibra hueca que tiene membranas de corte molecular de 10,000 dalton. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 232 g/L.

La solución de proteína concentrada, en una temperatura de 30° C, luego se diluye 1:9 en agua a 4° C. Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse durante 16 horas a 4° C. Se decanta 80 L del sobrenadante y se reduce en volumen mediante concentración de diafiltración en un volumen de 7 L de sobrenadante concentrado que tiene un contenido de proteína de 47.7 g/L.

- 5 La masa pegajosa viscosa sedimentada (PMM) se recolecta y se seca por congelamiento. Una porción de un litro del sobrenadante concentrado se congela por secado. Se obtiene 1393 g de PMM seco por congelamiento del proceso que tiene un contenido de proteína de 106% en peso (Nx6.25). 1 L del sobrenadante concentrado seco por congelamiento produce 67 g, ya que 7 L del sobrenadante concentrado contiene 469 g de la proteína seca, para una producción de proteína general de la proteína extraída de la harina de semilla de aceite de 47% en peso. El sobrenadante concentrado seco por congelamiento tiene un contenido de proteína de 83% en peso (Nx6.25) ya que una mezcla de PMM y la proteína del sobrenadante concentrado tienen un contenido de proteína de 102% en peso (Nx6.25) en una base en peso seco.

Ejemplo 14:

Este Ejemplo ilustra la aplicación de la invención para la semilla de mostaza.

- 15 Se agrega 75 g de harina de semilla de mostaza comercial a 750 ml de 0.15 M de solución de NaCl (15% p/p) a 20° C y se agita durante 30 minutos. La suspensión de extracción se centrifuga a 10,000 xg durante 10 minutos para separar la harina gastada de la proteína extraída. Los 500 ml resultantes de la solución de proteína que tiene un contenido de proteína de 18.05 mg/ml luego se filtra a través de filtros Whatman #4 con el fin de clarificar adicionalmente la solución.
- 20 La solución clarificada se concentra a 27 ml en un sistema de célula agitada de mini-ultrafiltración Millipore utilizando 10,000 membranas de corte de peso molecular. La solución de proteína concentrada resultante tiene una concentración de proteína de 218 g/L.

Luego se diluye 22.2 ml de los 27 ml totales de la solución de proteína concentrada, en una temperatura de 30° C, luego se diluye 1:9 en 4° C de agua de grifo. Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse durante 16 horas a 4° C. Se decanta 200 ml del sobrenadante.

- 25 La masa pegajosa, viscosa, sedimentada (PMM) se recolecta y se centrifuga a 10,000 xg durante 5 minutos para reducir el contenido de humedad del glóbulo, que luego se seca por congelamiento. Se obtiene 4.48 g del glóbulo seco por congelamiento, que representa una producción de la proteína en el glóbulo seco por congelamiento de la proteína en la proteína extraída de la harina de semilla de aceite es 50% en peso (si se han diluido los 27 ml completos del retenido, la producción final se extrae por ser aproximadamente 60% en peso). El PMM seco por congelamiento obtenido del proceso tiene un contenido de proteína de 103% en peso (Nx 6.25).

Ejemplo 15:

Este Ejemplo ilustra la aplicación del proceso de la invención en canola no GMO.

- 35 Se agrega 450 g de harina de canola no GMO a 3 L de 0.15 M de solución de NaCl (15% p/p) a 20° C y se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 8.08 g/L. La mezcla se deja reposar durante 30 minutos para permitir que se separe la harina residual y la solución de proteína. La solución de proteína se decanta, se centrifuga durante 10 minutos a 10,000 xg y se filtra a través de un papel de filtro Whatman #4 para clarificar adicionalmente la solución.
- 40 El filtrado luego se concentra en un volumen de 17 ml utilizando un sistema de ultrafiltración de fibra hueca que tiene membranas de corte de peso molecular de 10,000 dalton. La solución de proteína concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 205 g/L.
- 45 Una muestra de 14 ml del retenido, en una temperatura de 30° C, luego se diluye 1:9 en 4° C de agua de grifo. Una nube blanca se forma inmediatamente y se les deja sedimentarse. El sobrenadante se decanta y la masa pegajosa viscosa sedimentada (PMM) se recolecta y se seca por congelamiento. Se obtiene 2.3 g de PMM seco por congelamiento del proceso que tiene un contenido de proteína de 103% en peso (Nx 6.25).

La producción general de la proteína con respecto al extracto de la proteína de la harina de semilla de aceite es 41% en peso. Si los 17 ml completos del retenido se han diluido aproximadamente 2.66 g de la proteína seca se han recuperado para una producción de 46% en peso.

Ejemplo 16:

Este Ejemplo ilustra la recuperación del aislado de proteína de canola mediante un procedimiento de diálisis.

Se agrega 'a' kg de harina de canola comercial a 'b' L de 0.15 M de solución de NaCl a temperatura ambiente y se agita durante 30 minutos para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 'c' g/L. La harina de canola residual se remueve y se lava en una campana de filtro de vacío. La solución de proteína resultante se clarifica mediante centrifugación para producir 'd' L de una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de 'e' g/L.

Una alícuota 'f' de la solución de extracto de proteína se reduce en volumen a 'g' L mediante concentración en un sistema de ultrafiltración utilizando 'h' las membranas de corte de peso molecular en dalton. La solución concentrada resultante tiene un contenido de proteína de 'i' g/L. El retenido se da en la designación 'j'. Los parámetros 'a' a 'j' se bosquejan en la siguiente Tabla XI:

TABLA XI

j	BW-AL017-D17-02A	BW-AL017-D22-02A
a	150	150
b	1004	1003
c	25.1	27.1
d	1080	1132
e	18.0	16.5
f	710	1092
g	22.5	31.5
h	5000	5000
i	291.6	362.5

Se dializa 3.5 L del retenido de BW-AL017-D17-02A en 120 L de 4º C de agua. El agua se cambia diariamente durante varios días y se utiliza agua de corrida durante los últimos dos días. La conductividad del retenido cae de 6.89 milisiemens (ms) a 0.32 ms. Como la conductividad cae, las micelas se empiezan formar en el retenido. En la terminación de la diálisis, está presente una gran cantidad de PMM en el fondo de cada tubo de diálisis. El PMM se recupera y se seca. El aislado de proteína de canola tiene un contenido de proteína de 103.0% en peso d.b.

El procedimiento se repite con el retenido BW-AL017-D22-02A excepto que se lleva a cabo la diálisis en 60º C de agua. Como se reduce la conductividad, la solución llega a ser nubosa pero ocurre muy poca formación de micela. Una vez se enfriá la solución dializada a 10º C, ocurre la formación de micela. El PMM resultante, cuando se seca, tiene un contenido de proteína de 106% en peso de d.b.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

En resumen de esta descripción, la presente invención proporciona un procedimiento novedoso para aislar la proteína de las semillas de aceite en producciones mejoradas y el contenido de la proteína se ha alcanzado previamente. Son posibles modificaciones dentro del alcance de esta invención que se define por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar un aislado de proteína, que comprende:
 - (a) extraer una harina de semilla de aceite en una temperatura de por lo menos 5º C para originar la solubilización de la proteína en dicha harina de semilla de aceite y para formar una solución de proteína acuosa que tiene un contenido de proteína de 5 a 30 g/L y un pH de 5 a 6.8,
 - (b) separar la solución de proteína acuosa de la harina de semilla de aceite residual,
 - (c) incrementar la concentración de proteína de dicha solución de proteína acuosa a por lo menos 200 g/L mientras que se mantiene la resistencia iónica sustancialmente constante al utilizar una técnica de membrana selectiva para proporcionar una solución de proteína concentrada,
 - (d) diluir dicha solución de proteína concentrada en agua congelada que tiene una temperatura por debajo de 15º C para originar la formación de las micelas de proteína,
 - (e) sedimentar las micelas de proteína para formar una masa micelar como gluten, gelatinosa, pegajosa, amorfía, y
 - (f) recuperar la masa micelar de la proteína del sobrenadante que tiene un contenido de proteína de por lo menos 100% en peso como se determina por Nitrógeno Kjeldahl x 6.25 en una base en peso seco.
- 10 2. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha extracción de dicha harina de semilla de aceite se efectúa utilizando una solución de sal de grado alimenticio acuosa que tiene una resistencia iónica de por lo menos 0.10, preferiblemente 0.15 a 0.6 y un pH de 5 a 6.8, preferiblemente 5.3 a 6.2.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 2, en donde dicha extracción de dicha harina de semilla de aceite se efectúa con la agitación de dicha solución de sal de grado alimenticio acuosa durante 10 a 30 minutos.
- 20 4. El proceso de la reivindicación 2 o 3, en donde la concentración de harina de semilla de aceite en dicha solución de sal de grado alimenticio acuosa durante dicha etapa de extracción es 5 a 15% p/p y dicha solución de proteína acuosa que resulta de la etapa de extracción tiene una concentración de 10 a 25 g/L.
- 25 5. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha extracción de dicha harina de semilla de aceite se efectúa utilizando una solución de sal de grado alimenticio acuosa que tiene una resistencia iónica de por lo menos 0.10, preferiblemente 0.15 a 0.6, y un pH de 6.8 a 9.8 y, luego dicha separación de la solución de proteína acuosa de la harina de semilla de aceite residual, el pH de la solución de proteína acuosa se ajusta a un pH de 5 a 6.8, preferiblemente 5.3 a 6.2.
- 30 6. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha harina de semilla de aceite es harina de semilla de aceite de canola y, luego dicha separación de la solución de proteína acuosa de la harina de semilla de canola residual, la solución de proteína acuosa se somete a una etapa de remoción del pigmento, preferiblemente mediante diafiltración de la solución de proteína acuosa, o mezclar un agente de adsorción del pigmento, preferiblemente carbón activado en polvo, con la solución de proteína acuosa y posteriormente remover el agente de adsorción del pigmento de la solución de proteína acuosa.
- 35 7. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha harina de semilla de aceite se extrae mediante agua y posterior a esto la sal de grado alimenticio se agrega a la solución de proteína acuosa resultante para proporcionar una solución de proteína acuosa que tiene una resistencia iónica de por lo menos 0.10.
- 40 8. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha etapa de concentración se efectúa mediante ultrafiltración en una temperatura de 20º C a 60º C para producir una solución de proteína concentrada que tiene un contenido de proteína de por lo menos 250 g/L.
- 45 9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha solución de proteína concentrada se calienta a una temperatura de por lo menos 20º C, preferiblemente 25º a 40º C, para reducir la viscosidad de la solución de proteína concentrada pero entre una temperatura por encima de la cual la temperatura de la solución de proteína concentrada no permite la formación de micela luego de dilución.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha solución de proteína concentrada se diluye mediante 15 veces o menos, preferiblemente mediante 10 veces o menos, al agregar la solución de proteína concentrada en un cuerpo de agua que tiene el volumen requerido para alcanzar el grado deseado de dilución y preferiblemente que tiene una temperatura de menos de 10º C.

11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la masa micelar de proteína recuperada se seca en un polvo proteináceo.
- 5 12. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicha harina de semilla de aceite es harina de semilla de canola y, luego la recuperación de la masa micelar de la proteína de la misma, el sobrenadante se procesa para recuperar las cantidades adicionales del aislado de proteína de la misma.
- 10 13. El proceso de la reivindicación 12, en donde dichas cantidades adicionales del aislado de proteína se recuperan del sobrenadante (a) al concentrar el sobrenadante a una concentración de proteína de 100 a 400 g/L, preferiblemente 200 a 300 g/L, y secar el sobrenadante concentrado, o (b) al concentrar el sobrenadante en una concentración de proteína de 100 a 400 g/L, preferiblemente 200 a 300 g/L, mezclar el sobrenadante concentrado con la masa micelar de proteína recuperada, y secar la mezcla, o (c) al concentrar el sobrenadante en una concentración de proteína de 100 a 400 g/L, preferiblemente 200 a 300 g/L, mezclar una porción de dicho sobrenadante concentrado con por lo menos una porción de la masa micelar de proteína recuperada, y secar la mezcla resultante.
- 15 14. El proceso de la reivindicación 13, en donde el resto del sobrenadante concentrado en (c) se seca y cualquier resto de la masa micelar de proteína recuperada en (c) se seca.
- 20 15. El proceso de la reivindicación 1, en donde, como una alternativa para dichas etapas de recuperación, ajuste y dilución, la solución de proteína concentrada se dializa para reducir su contenido de sal y para originar la formación de las micelas de proteína, y recuperar un aislado de proteína de la solución de proteína concentrada dializada que tiene un contenido de proteína de por lo menos 100% en peso como se determina por Nitrógeno Kjeldahl x6.25 en una base en peso seco, preferiblemente al secar la solución de proteína concentrada dializada.
- 25 16. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde dicha harina de semilla de aceite es harina de semilla de aceite de canola, harina de semilla de colza o harina de semilla de mostaza.
17. El proceso de la reivindicación 16, en donde la harina de semilla de aceite de canola es harina de semilla de aceite de canola presionado en frío o se deriva de una semilla de aceite de canola no modificada genéticamente.
- 25 18. Un aislado de proteína de canola que tiene un contenido de proteína de por lo menos 90% en peso como se determina por Kjeldahl x 6.25 en una base en peso seco producida por el método de la reivindicación 13.

