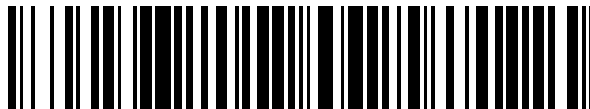


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 804**

21 Número de solicitud: 201430389

51 Int. Cl.:

C07C 227/28 (2006.01)

C07C 227/40 (2006.01)

A23L 1/20 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.03.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.10.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070133

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**VIOQUE PEÑA, Javier;
ALAIZ BARRAGAN, Manuel Santiago;
GIRON CALLE, Julio;
MEGÍAS BAEZA, Cristina y
CORTÉS GIRALDO, Isabel**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE AMINOÁCIDOS LIBRES DE INTERÉS A PARTIR DE HARINAS DE LEGUMINOSAS**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de aminoácidos libres de interés a partir de harinas de leguminosas.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de aminoácidos libres a partir de harinas de leguminosas, preferiblemente de garbanzos, que comprende las etapas de extracción, nanofiltrado, purificación mediante resinas de intercambio iónico y concentración del producto final. Este método es útil para obtener aminoácidos de interés tales como la arginina, homoarginina o canavanina, dependiendo del material de partida.

ES 2 548 804 A1

Procedimiento de obtención de aminoácidos libres de interés a partir de harinas de leguminosas

DESCRIPCIÓN

5

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de aminoácidos libres a partir de harinas de leguminosas, preferiblemente de garbanzos y de otras leguminosas muy ricas en aminoácidos libres como los g. *Vicia* y *Lathyrus*, que permite obtener de forma sencilla aminoácidos de interés como arginina, homoarginina o canavanina.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los aminoácidos libres tienen múltiples aplicaciones hoy día tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica. Se usan como suplementos nutricionales y también como saborizantes en el caso del glutámico. Pero también muchos tienen propiedades promotoras de la salud y se ha sugerido su uso para el tratamiento de diversas enfermedades.

15

En las leguminosas los aminoácidos libres se encuentran entre los compuestos secundarios más abundantes. Pueden clasificarse en proteicos y no proteicos. En el primer grupo están los veinte aminoácidos que forman parte de las proteínas. En el segundo están los aminoácidos descritos hasta la fecha (más de 240), que no forman parte de las proteínas. Por su interés alimentario y farmacológico, los aminoácidos arginina, canavanina, homoarginina y ácido glutámico son en principio los de mayor interés, en especial arginina, canavanina y homoarginina, por su implicación conjunta en la síntesis de óxido nítrico (NO), y su abundancia y predominio en el garbanzo y otras legumbres de los géneros *Vicia* y *Lathyrus*.

25

Los procesos de extracción de aminoácidos libres de interés a partir de material vegetal son conocidos desde hace tiempo tal y como describe el documento GB1377675, aunque es necesario mejorar el rendimiento y minimizar el uso de disolventes orgánicos y ácidos fuertes como el sulfúrico para reducir su impacto sobre el medio ambiente y la salud humana y animal.

30

El proceso de purificación de la arginina y otros aminoácidos que se realiza en la actualidad, se lleva a cabo a partir de la fermentación de microorganismos como por ejemplo se describe en el documento US 4,080,137. Estos procedimientos conllevan la manipulación de seres vivos y el uso de reactores de fermentación que implican la
5 necesidad de controles mucho más estrictos, complicados y costosos.

Por tanto, es de gran interés desarrollar procesos de obtención de aminoácidos libres que sean sencillos y eficientes y con una materia prima de fácil obtención y en los que se minimicen los costes de producción
10

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente invención, gracias a una combinación única de diversos procesos o etapas, se aprovechan las diversas propiedades físicas y químicas del material de partida (la harina de las leguminosas), de los diferentes compuestos presentes en estas harinas y del producto final (los aminoácidos) para la purificación de estos aminoácidos y la generación de fracciones de interés en alimentación y farmacia. Para ello se describe un procedimiento de purificación de compuestos y fracciones considerando sus distintas solubilidades según el pH (extracción alcalina, precipitación
15 ácida), sus distintas solubilidades según el porcentaje de etanol en la solución (precipitación o cristalización), según el diferente tamaño de sus moléculas (nanofiltración) y según sus afinidades químicas por soportes sólidos (resinas de intercambio iónico). A diferencia de otros procedimientos, que parten de materiales iniciales mucho menos heterogéneos y complejos, hay que considerar la complejidad
20 composicional de las harinas de las leguminosas a partir de las cuales se extraen y purifican los aminoácidos libres mencionados en la invención. Complejidad manifiesta en la diversidad de compuestos de características químicas (solubilidad, etc) y físicas (tamaño, etc) muy dispares y donde además los aminoácidos libres son una fracción minoritaria en comparación con compuestos como proteínas, fibra o carbohidratos. Sin
25 embargo, esta complejidad del material de partida hace que el procedimiento descrito presente otra ventaja añadida en comparación con otros relacionados y es la generación durante su desarrollo, gracias a la combinación única de diversos procesos, de subproductos que constituyen, además de los aminoácidos puros, otras
30

fracciones con interés en alimentación o farmacéutico y que se pueden explotar porque el material de partida son matrices alimenticias (harinas comestibles).

5 En la presente invención se describe un procedimiento de producción de aminoácidos libres a partir de material vegetal que es económicamente más ventajosa en comparación con la producción mediante fermentación. Los costes de reactivos son despreciables. El material fungible, resinas de intercambio iónico y nanomembranas, son baratas y reutilizables. La maquinaria necesaria es muy simple y en parte ya está presente en una planta de obtención de concentrados proteicos, como por ejemplo los
10 tanques de extracción, las centrifugas, los concentradores y los atomizadores. En conclusión, los costes de producción son despreciables en comparación con el valor añadido de los productos obtenidos.

15 Por otro lado, el proceso de purificación de la arginina y otros aminoácidos es comparablemente mucho más simple a como se realiza a partir de la fermentación de microorganismos. Esto implica la manipulación de seres vivos y el uso de reactores de fermentación que implican la necesidad de controles mucho más estrictos, complicados y costosos.

20 Por otro lado, además las fracciones ricas en componentes bioactivos que se generan durante el procedimiento de purificación de los aminoácidos libres presentan un valor añadido al proceso. Tal sería el caso de un concentrado proteico rico en isoflavonas, un nanoretenido rico en polifenoles, un nanofiltrado rico en aminoácidos libres y azúcares, los lavados con agua de la resina ricos en azúcares y los lavados con
25 amoníaco de la resina ricos en aminoácidos libres.

El proceso de aprovechamiento de la harina de garbanzo y otras legumbres es viable y rentable económicamente tanto en la industria alimentaria para la producción de extractos bioactivos, como en la farmacéutica para la producción y purificación de
30 aminoácidos como la arginina. Además, se incrementan los rendimientos y márgenes de beneficios de este proceso extendiendo su aplicación a harinas de otras legumbres más ricas en aminoácidos libres y con mayores riquezas en algunos aminoácidos en particular, tanto en especies silvestres como cultivadas de los géneros *Vicia* (aminoácido canavanina) y *Lathyrus* (aminoácido homoarginina).

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de aminoácidos libres a partir de harina de leguminosas que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) extracción de la harina de leguminosas;
 - b) nanofiltración del extracto acuoso obtenido en la anterior etapa;
 - c) purificación mediante resinas de intercambio iónico del nanofiltrado obtenido en la anterior etapa y
 - d) concentración y purificación del producto obtenido en la anterior etapa.
- 10 En una realización preferida, la leguminosa se selecciona de los géneros *Vicia* y *Lathyrus*.

En otra realización preferida, la leguminosa se selecciona de entre garbanzos, guisantes, judías, habas, alfalfa, lentejas, altramuces, cacahuetes, soja.

- 15 En una realización preferida, la extracción es ácida.

En otra realización preferida, la extracción es básica, seguida de una precipitación ácida resultando en la obtención de un concentrado rico en agliconas de isoflavonas.

- 20 En otra realización preferida, la nanofiltración de la etapa (b) se lleva a cabo con membranas que permiten el paso de moléculas con tamaño menor de 200 Da.

- 25 En otra realización preferida, la purificación de la etapa (c) se lleva a cabo mediante adsorción ácida a una resina catiónica y posterior desorción de ésta a pH básico.

En otra realización preferida, la concentración y purificación de la etapa (d) se realiza por precipitación.

- 30 En otra realización preferida, la concentración y purificación de la etapa (d) se realiza por cristalización.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o

pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: muestra el cromatograma obtenido por HPLC de la Arginina de garbanzo cristalizada.

10

Figura 2: muestra el cromatograma obtenido por HPLC de la Arginina de garbanzo precipitada.

EJEMPLOS

15

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

20

A) EXTRACCIÓN ALCALINA DE PROTEÍNAS Y OTROS COMPUESTOS SOLUBLES DE LA HARINA DE GARBANZO.

25

Las semillas de garbanzo se molieron en un molinillo doméstico y se usaron como material de partida para la extracción de los aminoácidos libres. Para ello, se realizó una extracción alcalina con agua llevada a pH 10.5 con NaOH 1 N con agitación durante 50 min a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se centrifuga (15.000 rpm / 20 min) y el pellet se extrae al menos dos veces más. El producto final es un extracto alcalino rico en proteínas y otros compuestos solubles a pH básico.

30

B) PRECIPITACION ACIDA DEL EXTRACTO ALCALINO.

Para la precipitación de las proteínas de este extracto alcalino, los sobrenadantes obtenidos en el paso A) se llevaron a pH ácido (en este caso 4.3). A continuación la mezcla se centrifugó (15.000 rpm / 20 min) y se obtuvo una fracción soluble (B2) rica en aminoácidos libres y otros compuestos solubles y una fracción sólida rica en proteínas (B1). Esta fracción B1 incluye también un alto porcentaje de las isoflavonas

de la semilla en su forma hidrolizada (aglicona). En el caso del garbanzo se trata en su mayor parte de la aglicona de la biochanina A.

C) NANOFILTRACIÓN.

5 La fracción soluble B2 obtenida en la etapa B, es nanofiltrada para purificar los aminoácidos libres de otros compuestos de mayor peso molecular. Para ello se usó una célula de filtración de Amicon a la que se incorporó una membrana de nanofiltración con un corte de paso en torno a los 200 Da. Como resultado de la nanofiltración se obtuvo un nanoretenido que es un producto rico en compuestos
10 mayores de 200 Da como proteínas y polifenoles. Por otro lado se obtuvo un nanofiltrado rico en compuestos menores de 200 Da como ácidos libres y monosacáridos.

D) PURIFICACIÓN MEDIANTE RESINAS DE INTERCAMBIO IONICO.

15 Para la purificación de los aminoácidos libres de otros compuestos de bajo peso molecular se usó una resina de intercambio catiónico fuertemente ácida, en concreto Amberlita IR-120. En primer lugar se realizó la incubación del nanofiltrado, conteniendo los aminoácidos libres, con la resina a pH 2 durante 30 min para permitir que los aminoácidos se unan a la resina de forma reversible. Posteriormente se
20 realizaron varios lavados (en este caso 4 lavados) de la resina con agua durante 10 minutos cada uno. De esta forma se eliminan compuestos nanofiltrados que no se hayan unido a la resina, como por ejemplo monosacáridos. Posteriormente se lavó la resina con NH_4 0.5 N durante 30 min una vez para desorber aminoácidos unidos débilmente a la resina. Finalmente los aminoácidos y una pequeña proporción de otros
25 compuestos son desorbidos de la resina con NH_4 concentrado (7,54 N).

E) PURIFICACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS LIBRES RECUPERADOS DE LA RESINA MEDIANTE PRECIPITACIÓN O CRISTALIZACIÓN.

La purificación final de los aminoácidos libres desorbidos de la resina se realiza
30 mediante precipitación o cristalización, en ambos casos usando etanol. Para la precipitación se añaden 4 volúmenes (o más de 4) de etanol en relación al volumen que se tenga de aminoácidos libres. Los aminoácidos precipitan de forma inmediata recuperándose mediante centrifugación o filtración y obteniéndose, en el caso del garbanzo, mayoritariamente arginina (90.73 %) con presencia de glutámico (6.37 %) y

aspártico (2.90 %) (comprobado por HPLC). Para la cristalización se añade etanol hasta turbidez y se deja 24 horas a temperatura. Tras este tiempo se recuperan los cristales mediante centrifugación, y que en el caso del garbanzo corresponde el 100% a arginina pura (comprobado por HPLC).

5

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de aminoácidos libres a partir de harina de leguminosas que comprende las siguientes etapas:
5 a) extracción de la harina de leguminosas;
 b) nanofiltración del extracto acuoso obtenido en la anterior etapa;
 c) purificación mediante resinas de intercambio iónico del nanofiltrado obtenido en la anterior etapa y
 d) concentración y purificación del producto obtenido en la anterior etapa.
10
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la leguminosa se selecciona de los géneros *Vicia* y *Lathyrus*.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la leguminosa se selecciona de
15 entre garbanzos, guisantes, judías, habas, alfalfa, lentejas, altramuces, cacahuetes, soja.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la extracción es ácida.
20
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que la extracción es básica, seguida de una precipitación ácida.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la
25 nanofiltración de la etapa (b) se lleva a cabo con membranas que permiten el paso de moléculas con tamaño menor de 200 Da.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la purificación de la etapa (c) se lleva a cabo mediante adsorción ácida a una resina catiónica y
30 posterior desorción de ésta a pH básico.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la concentración y purificación de la etapa (d) se realiza por precipitación.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde la concentración y purificación de la etapa (d) se realiza por cristalización.