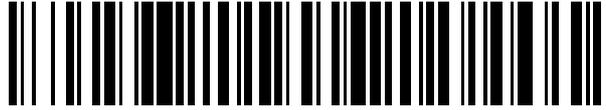


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 552**

51 Int. Cl.:

**A23J 1/00** (2006.01)  
**A23J 1/14** (2006.01)  
**A23J 3/14** (2006.01)  
**B01J 20/10** (2006.01)  
**A23L 1/015** (2006.01)  
**A23L 1/211** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.06.2010 E 10721030 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2437618**

54 Título: **Procedimiento para la separación de proteínas vegetales**

30 Prioridad:

**03.06.2009 DE 102009023740**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.01.2016**

73 Titular/es:

**SÜD-CHEMIE IP GMBH & CO. KG (100.0%)**  
**Lenbachplatz 6**  
**80333 München, DE**

72 Inventor/es:

**RUF, FRIEDRICH;**  
**SOHLING, ULRICH;**  
**KASPER, CORNELIA;**  
**RALLA, KATHRIN y**  
**SCHEPER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 557 552 T3**

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

Procedimiento para la separación de proteínas vegetales

5 El presente invento se refiere a un procedimiento para la separación de proteínas vegetales mediante utilización de un mineral de tres capas.

10 La demanda de fracciones proteínicas vegetales purificadas individuales, ha estado aumentando constantemente en los últimos años tanto en la industria de los alimentos y piensos así como también en la industria farmacéutica. En este caso, con arreglo a unos costes aumentados de energía y materias primas, es interesante, en particular, capturar y purificar unas proteínas que resultan como un producto de desecho en el caso de la elaboración de sustancias vegetales.

15 Especialmente un agua de vegetación de patatas, que resulta en grandes cantidades como un producto de desecho en el caso de la producción de almidón, contiene un gran número de proteínas, que tanto poseen un valor nutritivo cualitativamente alto como también presentan un gran interés, a causa de las más diversas funcionalidades, para el empleo en la producción de alimentos.

20 La mayoría de los procesos de aislamiento y purificación aplicados para proteínas, que son conocidos a partir del estado de la técnica, incluyen, junto a otros métodos de separación (p.ej. los de filtración), unas etapas cromatográficas. Los procedimientos cromatográficos son generalmente caros, contribuyendo el agente sorbente en gran medida a los costes. Los agentes intercambiadores de iones pertenecen a las fases estacionarias que se utilizan con la mayor frecuencia. En lo que se refiere a la pureza del producto diana y para la prolongación de los períodos de tiempo de estabilidad en estado útil (de vida útil) del agente sorbente, tienen una alta relevancia la regeneración, la purificación y la esterilización realizadas a continuación de la etapa de separación. Éstas requieren, un consumo en parte muy alto de agua, tampones o disolventes. Además de ello, los materiales para la cromatografía, en el caso de una utilización múltiple, tienen que ser comprobados continuamente en cuanto a su rendimiento de separación o a unas contaminaciones con microbios.

30 Otros métodos, conocidos a partir del estado de la técnica, para la purificación de soluciones que contienen proteínas, requieren la desnaturalización de una o varias fracciones proteínicas, de tal manera que éstas ya no se presentan en una forma biológicamente activa y carecen de valor para la mayoría de los usos. Por ejemplo, unas proteínas de patatas desnaturalizadas pierden su capacidad de actuar como agentes emulsionantes, agentes formadores de espuma, agentes formadores de geles y su función para la fijación de agua así como su solubilidad en agua y, por consiguiente, se han vuelto sin valor para todos los sectores de uso en la industria de los alimentos.

35 A continuación, se presenta una recopilación acerca de los procedimientos conocidos dentro del estado de la técnica para la purificación de un agua de vegetación de patatas como un ejemplo de una solución que contiene proteínas:

40 En el documento de patente europea EP 0487480 B1 se describe un procedimiento para la purificación de un agua de vegetación de patatas, en el que una parte de las proteínas se desnaturaliza mediante calentamiento y en la solución remanente la parte de las proteínas que sigue siendo activa es separada con respecto del agua mediante una ultrafiltración. También en el presente caso, una gran parte de las valiosas proteínas de patatas (y de otras sustancias constituyentes) se pierde por medio del tratamiento por calor. El documento de solicitud de patente de los EE.UU. US 2003/009251 A1 divulga un procedimiento, en el que se purifican unos agentes inhibidores de proteasas, mediante el recurso de que en primer lugar se extrae por disolución un gran número de diferentes fracciones proteínicas mediante una extracción exenta de alcoholes a partir de un apropiado material vegetal, y las proteínas indeseadas (tales como por ejemplo unos agentes inhibidores de carboxipeptidasas) se desnaturalizan mediante acción del calor y el material desnaturalizado se separa mediante centrifugación.

50 También en el documento de patente alemana DE 2814922 y en el documento de patente de los EE.UU. US 6.686.456 B2, un agua de vegetación de patatas o respectivamente un extracto proteínico se purifica a partir de un material vegetal solamente mediante una coagulación por acción del calor y una centrifugación.

55 Por lo demás, se conocen unos procedimientos, en los que la purificación no se lleva a cabo mediante una coagulación por acción del calor sino mediante una coagulación enzimática (Bihac, J.R. A modified method to purify patatin from potato tubers [Un método modificado para purificar una patatina a partir de unos tubérculos de patatas]; J. Agric. Food. Chem., 1991, 39, 1411-1415).

60 En el documento de solicitud de patente internacional WO 97/42834 se describe un procedimiento para la purificación de proteínas de patatas, en cuyo caso la proteína de patatas no desnaturalizada se aumenta de concentración y opcionalmente se seca, no sobrepasando los 40 °C las temperaturas de desecación. El aumento de la concentración se puede llevar a cabo en este caso mediante filtración (de manera preferida ultrafiltración), evaporación, adsorción con elución, o una mezcla de estos métodos. El proceso implica también opcionalmente un tratamiento previo de la proteína no desnaturalizada mediante una floculación, que se lleva a cabo con fosfato de calcio. En otras etapas adicionales del procedimiento, la proteína se purifica mediante una ultrafiltración.

Un procedimiento, en el que las proteínas de patatas se purifican mediante una "expanded bed adsorption" (adsorción en un lecho expandido), ha sido descrito por Straetkvern, K.O. y colaboradores (Expanded bed adsorption for recovery of patatin from crude potato juice [Adsorción en un lecho expandido para la recuperación de patatina a partir de un jugo crudo de patatas]; Bioseparation 7: 333-345, 1999): Un procedimiento similar se describe en el documento de solicitud de patente europea EP 1 920 662 A1 así como también en el documento WO 2008/069650, combinándose en el presente caso la etapa de "adsorción en un lecho expandido" con una precedente floculación del agua de vegetación de patatas.

En el documento de solicitud de patente alemana DE 10 2005 060392 A1 se utiliza un procedimiento para la separación de proteínas a partir de unos medios líquidos, utilizándose un material arcilloso.

En el documento de solicitud de patente internacional WO 2008/056977 A1 se describe un procedimiento para la separación de proteínas y también de glicoalcaloides a partir de, por ejemplo, un agua de vegetación de patatas, mencionándose un silicato en capas (estratificado) tal como un mineral arcilloso del tipo de esmectita, tal como una montmorillonita, bentonita, saponita, hectorita o también vermiculita.

Los procedimientos conocidos a partir del estado de la técnica tienen en común el hecho de que ellos o bien requieren el empleo de unos materiales caros, como se da el caso al realizar unos métodos cromatográficos, o tienen como consecuencia la desnaturalización de por lo menos una fracción proteínica, de tal manera que estas proteínas se han vuelto carentes de valor para otras posibilidades de uso. Además de ello, todos los métodos conocidos a partir del estado de la técnica requieren un gran número de etapas de tratamiento previo y/o posterior, tales como una extracción previa de las proteínas mediante unos disolventes no alcohólicos y una posterior separación por centrifugación del extracto o del material desnaturalizado.

Por lo tanto, subsiste una necesidad de un procedimiento, que haga posible la purificación deliberada de unas fracciones proteínicas individuales de origen vegetal, en cuyo caso, por una parte, todas las proteínas conserven su forma activa, y por consiguiente sus posibles funciones, pero que, por otra parte, también sea ahorrativo de costos y que dedique poco tiempo para su realización, de tal manera que él sea apropiado también para el empleo a gran escala industrial.

El presente invento pone a disposición por fin un procedimiento para la separación de proteínas vegetales, que comprende la etapa de

a) poner en contacto una solución proteínica con un mineral de tres capas, que se escoge entre el conjunto que se compone de los minerales de tres capas producidos de una manera natural o artificial, que pueden ser tratados previamente en condiciones ácidas o alcalinas y/o que contienen una cierta proporción de un gel de sílice, poseyendo el mineral de tres capas una capacidad de intercambio de cationes de por lo menos 50 meq/ 100 g del mineral de tres capas.

En este caso se encontró de manera sorprendente que unos minerales de tres capas, que poseen una capacidad de intercambio de cationes de por lo menos 50 meq/ 100 g del mineral de tres capas, son especialmente bien apropiados para la separación de unas fracciones proteínicas. Los minerales de tres capas, que se emplean en el procedimiento conforme al invento, antes de ser empleados en el procedimiento conforme al invento, pueden ser tratados previamente en condiciones ácidas o alcalinas y/o contienen una cierta proporción de un gel de sílice.

El procedimiento conforme al invento posee, en comparación con los procedimientos conocidos a partir del estado de la técnica, la ventaja de que todas las proteínas separadas conservan su actividad, y pueden ser utilizadas ulteriormente para cualquier sector de uso concebible. Además de esto, los minerales de tres capas se pueden adquirir a un precio barato en grandes cantidades. Otra ventaja adicional del procedimiento conforme al invento reside en que él se puede llevar a cabo de un modo sencillo y sin gran dedicación de tiempo, lo que contribuye asimismo al ahorro de costes. Además, el procedimiento conforme al invento se puede llevar a cabo tanto discontinuamente como un procedimiento por tandas (en inglés batch), como también de un modo continuo a través de un empaquetamiento en columnas del correspondiente mineral de tres capas, y hace posible por consiguiente un ajuste muy flexible a las respectivas circunstancias de producción.

Dentro del marco del presente invento, por el concepto de "proteína vegetal" se entiende cualquier proteína, que sea de origen vegetal, es decir que pueda ser extraída a partir de plantas y/o que sea formada por plantas. Las plantas (*Plantae*) forman un reino propio dentro del dominio de los seres vivos, con un núcleo celular y una membrana celular (organismos eucariotas) y abarcan dentro del marco del presente invento también musgos, plantas vasculares así como algas verdes y rojas. Unas plantas preferidas dentro del marco del presente invento, son unas plantas que contienen almidón y/o unos tubérculos, de manera especialmente preferida, las plantas conformes al presente invento se escogen entre el conjunto que se compone de maíz, arroz, cebada, trigo, centeno, avena, mijo, soja, tapioca, topinambur, patatas y batatas, yuca, mandioca, tania, caña de Indias o sagú, ñame, maranta, taro y farro, siendo preferidas especialmente las patatas.

Por el concepto de "proteína" se entiende dentro del marco del presente invento cualquier molécula, que comprenda por lo menos dos aminoácidos. Por consiguiente, dentro del marco del presente invento están abarcados por el concepto de "proteína" también péptidos, oligopéptidos y polipéptidos.

5 Por el concepto de "mineral de tres capas", dentro del marco del presente invento se entiende un aluminosilicato o silicato de magnesio que está constituido a modo de capas (estratificado) . Éstos están constituidos a base de tetraedros y octaedros. Los tetraedros de Si forman en la reunión las capas tetraédricas, existiendo la posibilidad de una sustitución del Si por p.ej. Al o Fe. Los tetraedros están unidos entre ellos por tres átomos de oxígeno basales. Un cuarto átomo de oxígeno une a las capas tetraédricas con la capa octaédrica. Una unión lateral de los octaedros  
10 unos con otros resulta por medio de la ocupación en común de las aristas. A los minerales de tres capas pertenecen las pirofilitas de talco, las tierras de mica, las vermiculitas y las esmectitas. Estos conjuntos se diferencian unos de otros en la carga eléctrica de sus capas, que resulta a través de unas sustituciones isomorfas. Por ejemplo, las vermiculitas se deslindan de las esmectitas por una más alta carga eléctrica de sus capas que resulta a partir de una proporción más alta de sustituciones en las capas tetraédricas, mediante lo cual las vermiculitas tienen p.ej. una más  
15 pequeña capacidad de hinchamiento, así como por una determinada disposición de las sustituciones en el caso de las vermiculitas que, al contrario que las esmectitas, se presentan distribuidas aleatoriamente.

Unos minerales de tres capas preferidos dentro del marco del presente invento tienen un contenido de SiO<sub>2</sub> de por lo menos 50 % en peso, de manera más preferida de por lo menos 55 % en peso, de manera particularmente preferida de por lo menos 60 % en peso, de manera aún más preferida de por lo menos 65 % en peso y de manera todavía más preferida de por lo menos 70 % en peso. Asimismo, se puede preferir que los minerales de tres capas tengan, dentro del marco del presente invento, un contenido de Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 2,5 a 5,5 % en peso, de manera preferida de 2,7 a 5,2 % en peso y de manera más preferida de 2,8 a 4,9 % en peso. Puede siguiendo ser preferido que los minerales de tres capas tengan, dentro del marco del presente invento, un contenido de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de 9,0 a 20,0 % en peso, de  
20 manera preferida de 9,4 a 18,5 % en peso y de manera más preferida de 9,8 a 15,5 % en peso.

Dentro del marco del presente invento, el mineral de tres capas se escoge preferiblemente entre el conjunto que se compone de los silicatos en capas esmectíficos y no esmectíficos así como por unas mezclas de éstos.

30 Las esmectitas tienen una carga eléctrica de las capas situada entre 0,2 y 0,6 por cada unidad de fórmula. En las capas octaédricas están incorporados en primer lugar unos cationes trivalentes (las esmectitas dioctaédricas) o unos cationes divalentes (las esmectitas trioctaédricas). Partiendo de los dos silicatos de 2:1 capas no cargados eléctricamente, talco y pirofilita, las estructuras se derivan de los minerales arcillosos esmectíficos individuales. Partiendo de la estructura de la pirofilita, mediante una sustitución parcial de los iones de Al<sup>3+</sup> resulta la capa octaédrica de montmorillonita, mientras que la beidellita procede de la sustitución de Si<sup>4+</sup> por Al<sup>3+</sup> en la capa tetraédrica. Análogamente a esto, es posible una derivación de las esmectitas trioctaédricas a partir del talco reemplazando el Si<sup>4+</sup> en la capa tetraédrica por unos iones trivalentes tales como Al<sup>3+</sup> (p.ej. en el caso de las saponitas) o el Mg<sup>2+</sup> en la capa octaédrica se reemplaza por Li<sup>+</sup> (como en el caso de unas hectoritas). En todos los casos, en dependencia del grado de sustitución con unos iones que están más reducidamente cargados  
35 eléctricamente, se produce una carga eléctrica negativa permanente de las capas. La carga eléctrica negativa es equilibrada por medio de la incorporación de unos cationes situados entre las capas. Es posible un intercambio de estos cationes.

Las esmectitas contienen agua en diferentes formas: Ésta puede ser retenida capilarmente en unos microporos o se puede presentar asociada a la superficie interna o externa en el espacio intermedio entre las capas.  
45

De acuerdo con una forma de realización especialmente preferida, los silicatos de capas de tipo esmectífico se escogen entre el conjunto que se compone de bentonitas, beidellitas, saponitas, montmorillonitas, hectoritas y estevensitas, y los silicatos de capas de tipo no esmectífico se escogen entre el conjunto que se compone de vermiculitas.  
50

Los minerales de tres capas que se emplean en el procedimiento conforme al invento pueden ser tratados previamente en condiciones ácidas o básicas. Por el concepto de "un tratamiento previo en condiciones ácidas o básicas" dentro del marco del presente invento se entiende el tratamiento del mineral de tres capas conforme al invento de manera preferida con un ácido orgánico, que se escoge de manera especialmente preferida entre el conjunto que se compone de ácido cítrico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido málico y unas mezclas de éstos. El tratamiento se puede efectuar en este caso de cualquier manera que sea conocida por un experto en la especialidad como apropiada para la finalidad conforme al invento, y él se efectúa de manera preferida mediante una molienda simultánea del mineral de tres capas con el ácido o mediante una rociadura o inmersión del mineral de tres capas con/en el ácido.  
55  
60

Los minerales de tres capas que se emplean en el procedimiento conforme al invento pueden contener además de ello (junto a, o también sin, un tratamiento previo) una cierta proporción de un gel de sílice. La proporción del gel de sílice es de manera preferida de 0,01 a 80 % en peso (referida al peso del mineral de tres capas), de manera preferida de 0,1 a 65 % en peso y de manera aún más preferida de 1 a 50 % en peso. Un cierto contenido del gel de sílice conduce a unos minerales de tres capas que tienen un comportamiento de hinchamiento fuertemente reducido  
65

o incluso no tienen ninguno, de tal manera que especialmente estos minerales de tres capas se pueden emplear ventajosamente en unas columnas o en unas capas de filtración. En particular, estos minerales de tres capas que contienen gel de sílice son apropiados también para el empleo en unas filtraciones con arrastre y se pueden sedimentar con facilidad.

5 Por el concepto de "capacidad de intercambio de cationes", se entiende dentro del marco del presente invento la suma de todos los cationes intercambiables. La capacidad de intercambio de cationes comprende en este caso por ejemplo la suma de todos los cationes di- y monovalentes intercambiables tales como los iones de calcio, magnesio, sodio, litio y potasio. Para la determinación de la capacidad de intercambio de cationes, el mineral de tres capas se trata con una solución de cloruro de amonio. En este caso, a causa de la alta afinidad de los iones de amonio para el mineral de tres capas, prácticamente todos los cationes intercambiables se intercambian por iones de amonio. Después de haber separado y lavado, se determina el contenido de nitrógeno del mineral de tres capas y a partir de éste se calculan el contenido de iones de amonio así como la capacidad de intercambio de cationes.

15 La capacidad de intercambio de cationes se determina dentro del marco del presente invento tal como se describirá seguidamente en la parte de método.

La capacidad de intercambio de cationes del mineral de tres capas se sitúa en este caso en por lo menos 50 meq/ 100 g del mineral de tres capas, de manera preferida en por lo menos 55 meq/ 100 g, de manera más preferida en por lo menos 60 meq/ 100 g, de manera aún más preferida en por lo menos 65 meq/ 100 g, de manera asimismo preferida en por lo menos 70 meq/ 100 g y de manera sumamente preferida en por lo menos 80 meq/ 100 g.

20 De acuerdo con otra forma de realización del presente invento, el mineral de tres capas comprende además de ello una o varias fase(s) amorfa(s). El contenido de gel de sílice no debería sobrepasar en total una proporción de 80 % en peso (referida al peso del mineral de tres capas), de manera preferida de 65 % en peso, y de manera sumamente preferida de 50 % en peso, pudiéndose escoger libremente la proporción de gel de sílice dentro de los límites preferidos.

25 Junto al mineral de tres capas y a las fases amorfas, las arcillas conformes al invento pueden contener también uno o varios minerales secundarios, que se escogen entre el conjunto que se compone de cuarzo, cristobalita, feldespato, calcita, dolomita y sus mezclas. La proporción de los minerales secundarios en el material total debería ser más pequeña que 30 % en peso, de manera preferida más pequeña que 20 % en peso, de manera especialmente preferida más pequeña que 10 % en peso. En este caso, es particularmente preferido que la proporción de cuarzo y de cristobalita en el mineral de tres capas sea más pequeña que 10 % en peso, de manera preferida más pequeña que 7 % en peso, de manera más preferida más pequeña que 5 % en peso y de manera sumamente preferida más pequeña que 2 % en peso.

30 De acuerdo con otra forma de realización conforme al invento, el mineral de tres capas posee un tamaño medio de partículas de 1 µm a 1,5 mm, de manera preferida de 5 µm a 0,5 mm, de manera especialmente preferida de 0,1 µm a 1 mm. Los tamaños de partículas preferidos conforme al invento hacen posible, por una parte, poner a disposición una superficie todavía aceptable de los agentes adsorbentes y, por otra parte, minimizar las pérdidas de presión. El tamaño de partículas se puede caracterizar en este caso, por ejemplo, mediante un análisis granulométrico por tamizado. En el presente caso, una muestra se tamiza a través de unos tamices con diferentes anchuras de mallas, y el residuo que queda sobre el tamiz se determina en tantos por ciento en peso. Esto es válido en particular en el caso de unos usos técnicos como una medida de la finura del polvo. Adicionalmente, se pueden llevar a cabo todavía unas investigaciones por dispersamiento de la luz en el aire, con el fin de determinar el tamaño medio de partículas.

35 De acuerdo con otra forma de realización conforme al invento, el mineral de tres capas posee un tamaño medio de partículas de 1 µm a 1,5 mm, de manera preferida de 5 µm a 0,5 mm, de manera especialmente preferida de 0,1 µm a 1 mm. Los tamaños de partículas preferidos conforme al invento hacen posible, por una parte, poner a disposición una superficie todavía aceptable de los agentes adsorbentes y, por otra parte, minimizar las pérdidas de presión. El tamaño de partículas se puede caracterizar en este caso, por ejemplo, mediante un análisis granulométrico por tamizado. En el presente caso, una muestra se tamiza a través de unos tamices con diferentes anchuras de mallas, y el residuo que queda sobre el tamiz se determina en tantos por ciento en peso. Esto es válido en particular en el caso de unos usos técnicos como una medida de la finura del polvo. Adicionalmente, se pueden llevar a cabo todavía unas investigaciones por dispersamiento de la luz en el aire, con el fin de determinar el tamaño medio de partículas.

40 La elección del tamaño de partículas depende en particular del proceso que se lleve a cabo. Si se emplea un proceso por tandas (discontinuo), con el fin de separar a la solanina y a las proteínas menores de las patatas, entonces se prefieren unos tamaños de partículas relativamente finos. Éstos deberían ser entonces de manera preferida más pequeños que 100 µm. Si las proteínas menores y/o los glicoalcaloides deben de ser separados mediante una filtración en tierra de diatomeas (kieselgur), usualmente se utilizan también unos tamaños de partículas que están comprendidos entre 20 µm y 100 µm. Por el contrario, en el caso de un empleo de los materiales conformes al invento para el proceso de separación precedentemente expuesto en unas columnas técnicas, se tienen que emplear unos tamaños de partículas más grandes, con el fin de minimizar las pérdidas de presión. Para esto se emplean usualmente unos tamaños de partículas de 0,3 mm a 1 mm. Esto requiere entonces, antes del proceso de separación, transformar a las arcillas o las tierras de batán empleadas, que por regla general se presentan en forma de un polvo con unos tamaños medios de partículas situados entre 1 µm y 100 µm, por medio de un proceso de granulación, en unas partículas más grandes.

45 La elección del tamaño de partículas depende en particular del proceso que se lleve a cabo. Si se emplea un proceso por tandas (discontinuo), con el fin de separar a la solanina y a las proteínas menores de las patatas, entonces se prefieren unos tamaños de partículas relativamente finos. Éstos deberían ser entonces de manera preferida más pequeños que 100 µm. Si las proteínas menores y/o los glicoalcaloides deben de ser separados mediante una filtración en tierra de diatomeas (kieselgur), usualmente se utilizan también unos tamaños de partículas que están comprendidos entre 20 µm y 100 µm. Por el contrario, en el caso de un empleo de los materiales conformes al invento para el proceso de separación precedentemente expuesto en unas columnas técnicas, se tienen que emplear unos tamaños de partículas más grandes, con el fin de minimizar las pérdidas de presión. Para esto se emplean usualmente unos tamaños de partículas de 0,3 mm a 1 mm. Esto requiere entonces, antes del proceso de separación, transformar a las arcillas o las tierras de batán empleadas, que por regla general se presentan en forma de un polvo con unos tamaños medios de partículas situados entre 1 µm y 100 µm, por medio de un proceso de granulación, en unas partículas más grandes.

50 Con el fin de ajustar un deseado tamaño preferido de partículas, se puede usar cualquier procedimiento que sea conocido por un experto en la especialidad como apropiado para la finalidad conforme al invento, pero de manera preferida el tamaño de partículas se ajusta mediante una técnica de granulación, tal como por ejemplo una compactación o una granulación con un agente aglutinante acuoso en una capa fluidizada producida mecánicamente. Las partículas se pueden estabilizar, además de ello, a continuación mediante un tratamiento a

altas temperaturas. En el caso de que, al referirse al mineral de tres capas, se trate de una fase mixta a base de una (o varias) arcilla(s) esmectítica(s) y de un gel de sílice, se prefiere machacar previamente de manera grosera al mineral de tres capas (fase mixta), a continuación, llevar a cabo una limpieza en húmedo y desmenuzar ulteriormente las partículas gruesas que han quedado en este caso; también en el presente contexto es posible realizar una estabilización mediante una desecación o un uso de altas temperaturas. Una desecación o un uso de altas temperaturas poseen la ventaja de que se obtienen unas partículas con una alta porosidad pero también con una estabilidad mecánica apropiada.

De acuerdo con otra forma de realización conforme al invento, la solución proteínica posee de manera preferida un valor del pH de 5,0 a 9,0, de manera más preferida de 5,2 a 8,8, de manera aún más preferida de 5,5 a 8,5, de manera todavía más preferida de 5,8 a 8,2, de manera especialmente preferida de 6,0 a 8,0 y de manera sumamente preferida de 6,2 a 7,5.

De acuerdo con otra forma de realización del presente invento, en el caso de la solución proteínica se trata de manera preferida de un agua de vegetación de plantas. Por el concepto de "un agua de vegetación de plantas" se entiende en este contexto cualquier solución que contenga un material vegetal. De manera preferida, la solución se obtiene mediante un prensado de plantas enteras o de partes de plantas. La solución se puede obtener, sin embargo, también mediante una extracción de plantas o de partes de plantas, empleándose como disolvente de manera preferida agua. Dentro del marco del presente invento se puede emplear sin embargo cualquier disolvente que sea conocido por un experto en la especialidad como apropiado para la finalidad conforme al invento. Por lo demás, el agua de vegetación de plantas se puede producir mediante cualquier procedimiento que sea conocido por un experto en la especialidad como apropiado para la finalidad conforme al invento.

De acuerdo con un procedimiento especialmente preferido conforme al invento, en el caso del agua de vegetación de plantas se trata de un agua de vegetación de patatas.

El agua de vegetación de patatas resulta, en el caso de la obtención industrial de un almidón, como un producto secundario líquido, que contiene aproximadamente 1,8 % de proteínas.

Las proteínas presentes en el agua de vegetación de patatas se pueden subdividir en tres grandes conjuntos. Al primer conjunto pertenecen las isoformas de la patatina. En el caso de las patatinas se trata de una clase de aproximadamente 15 diferentes isoformas de glicoproteínas que son inmunológicamente idénticas, y tienen una masa molecular de aprox. 40-43 kDa y unos puntos isoeléctricos situados entre unos pH de 4,6 y 5,2. Las patatinas que están localizadas en los vacuolos de las células parenquimatosas, se presentan en su forma natural como unos dímeros u oligómeros. Una patatina constituye aproximadamente un 40-60 % de las proteínas solubles en los tubérculos de patatas y, a causa de su alta acumulación, se considera como una proteína almacenadora. Al contrario que otras proteínas almacenadoras, ella tiene una actividad enzimática (una actividad de acilhidrolasa así como de aciltransferasa de lípidos). Una patatina muestra una amplia especificidad para los substratos y es activa hidrolíticamente frente a fosfolípidos, lípidos neutros (mono- y diacilgliceroles), glicolípidos y ésteres de ácidos grasos de cadenas largas. Se puede consignar una actividad enzimática especialmente alta en el caso de unas longitudes de las cadenas de C8/C10 y de C14/C16. Una patatina como monómero se compone de 366 aminoácidos y está glicosilada en N junto a la asparagina 60 y la asparagina 90, constituyendo las glicosilaciones aproximadamente un 4 % de la masa molecular. A causa de una alta calidad fisiológica - nutritiva y de una equilibrada composición de aminoácidos, una patatina, aislada en su forma funcional, sería un componente proteínico interesante para la industria alimentaria.

El segundo conjunto de proteínas de patatas se compone de siete clases diferentes de agentes inhibidores de proteasas, que representan en común aproximadamente un 20-30 % de la proteína global (proteína menor de patata). En el caso de los agentes inhibidores de proteasas se trata, al contrario que las patatinas, de un conjunto heterogéneo de proteínas, que se diferencian tanto en su secuencia de aminoácidos, en su peso molecular así como también en su actividad.

Los agentes inhibidores de proteasas son considerados por lo general como unas proteínas almacenadoras (una fuente de nitrógeno) y participan en la defensa inducida por lesiones frente a animales herbívoros y agentes patógenos. En los últimos años ha aumentado el interés en los agentes inhibidores de proteasas de patatas a causa de su actividad anticarcinógena. El efecto anticarcinógeno se pudo comprobar tanto *in vitro* como también *in vivo* y se manifiesta p.ej. a través de una actividad inhibidora de la proliferación de los agentes inhibidores de serina proteasas frente a células tumorales. El más alto efecto anticarcinógeno parte de unos agentes inhibidores de proteasas con una actividad inhibidora de la quimotripsina.

Basándose en un efecto saturador, ellas se pueden emplear en el sector de los alimentos funcionales (en inglés "Functional Food"). El efecto de saturación se basa en la liberación del péptido intestinal colecistoquinina por medio de la inhibición de tripsina.

La tercera clase de las proteínas de patatas la constituyen las polifenol oxidasas (que constituyen aprox. 20-30 % de la proteína global), las cuales catalizan la oxidación de unos polifenoles para dar unas orto-quinonas. Las polifenol

oxidasas constituyen de este modo un factor decisivo en unas reacciones de caramelización en frutas y legumbres. Dos de las polifenol oxidasas más importantes son la tirosinasa (que cataliza la conversión química de monofenoles y orto-difenoles) y la laccasa (que cataliza la oxidación de orto- y para-difenoles, así como de unos polifenoles sustituidos y de unas aminas aromáticas).

5 Junto a las fracciones proteínicas individuales, que se han descrito precedentemente, un agua de vegetación de patatas contiene también todavía una serie de otros componentes adicionales, entre los cuales les corresponde una importancia especial a los glicoalcaloides.

10 Los glicoalcaloides (en primer término aprox. 60 % de  $\alpha$ -chaconina y aprox. 40 % de  $\alpha$ -solanina) se presentan en todas las partes de una planta de patata como unos metabolitos secundarios. En la cáscara de los tubérculos, en las flores y en los brotes se presentan unas concentraciones especialmente altas de glicoalcaloides.

15 En el estado de la técnica se conocen desde hace mucho tiempo múltiples y variadas repercusiones negativas de los glicoalcaloides de patatas sobre unas típicas etapas de procesos en la elaboración de alimentos. Además de esto, la alta estabilidad térmica de los glicoalcaloides se ha descrito múltiples veces, de tal manera que éstos no son eliminados automáticamente ni siquiera a unas altas temperaturas. También la cocción, la fritura o el tratamiento con microondas, incluso en el caso de un calentamiento a unas temperaturas por encima de 170 °C, conducen solamente a una pequeña reducción del contenido de glicoalcaloides. A causa de las propiedades tóxicas así como del sabor amargo, tiene una especial importancia el hecho de eliminar los glicoalcaloides de patatas a partir del agua de vegetación de patatas o respectivamente de las proteínas purificadas, con el fin de poder utilizar

20 ulteriormente la proteína aislada por ejemplo en la industria de los alimentos o los piensos. Junto a esto, muchos glicoalcaloides son fuertemente hidrófobos y por lo tanto difíciles de extraer mediante unos habituales métodos de extracción.

25 Los glicoalcaloides de la patata, debido a su efecto inhibitorio sobre las acetil- y butil-colinesterasas, actúan tóxicamente sobre el sistema nervioso central (por inhibición de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina) y dañan a las membranas celulares en el sistema digestivo y en otros sistemas de órganos. Por lo demás, son probables ciertas interferencias con el metabolismo de los esteroides o respectivamente de los esteroides. Estos efectos pueden conducir a unos trastornos gastrointestinales, a unos trastornos neurológicos, al delirio, al coma o a la muerte. Unas primeras repercusiones aparecen en el caso de unas concentraciones de aproximadamente 1-3 mg/kg de peso corporal. Unas concentraciones a partir de aproximadamente 3-6 mg/kg de peso corporal pueden actuar letalmente.

35 Junto a estas desventajosas propiedades, que conciernen sobre todo a la producción de alimentos, los glicoalcaloides poseen, sin embargo, también ciertos efectos farmacéuticos positivos. En unos estudios, que se ocupan de las repercusiones de unos glicoalcaloides procedentes de diferentes solanáceas sobre la proliferación de células cancerígenas, se detectó un efecto inhibitorio de la proliferación. Éste se basa en la destrucción de las membranas celulares por medio de una modificación del potencial de las membranas, así como en unas roturas en la membrana mediante una inserción de los glicoalcaloides en las membranas. Por otra parte, puede tener lugar una inducción de una apoptosis.

40

La aglicona de  $\alpha$ -solanina y  $\alpha$ -chaconina (solanidina) se está debatiendo, además de esto, como un compuesto de partida para la síntesis de la deshidropregnenolona (DPA). Basándose en la DPA se preparan diferentes hormonas esteroides, tales como p.ej. la progesterona, unos estrógenos o la cortisona.

45

A causa de su actividad biológica, la  $\alpha$ -chaconina y la  $\alpha$ -solanina son en principio extremadamente atractivas para usos farmacéuticos, de tal manera que una purificación del agua de vegetación de patatas, aplicable a una gran escala industrial, es interesante también desde este punto de vista.

50 Si el procedimiento conforme al invento se aplica por ejemplo a un agua de vegetación de patatas, entonces en la etapa a) se separan simultáneamente las proteínas menores de patatas y los glicoalcaloides, permaneciendo en la solución las patatinas, y las proteínas restantes (entre ellas esencialmente las proteínas menores) y los glicoalcaloides son adsorbidas al mineral de tres capas. Puesto que dentro del marco del procedimiento conforme al invento, todas las fracciones proteínicas conservan su(s) actividad(es), ellas son empleables para todos los

55 posteriores sectores de uso posibles.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, el procedimiento conforme al invento abarca por lo demás las etapas de

60 b) separar la solución proteínica puesta en contacto según la etapa a) y el mineral de tres capas;

c) poner en contacto el mineral de tres capas de la etapa b) con una solución tamponadora o una solución tamponadora altamente salina.

65 Las patatinas pueden ser extraídas a partir de la solución mediante unos métodos conocidos en el estado de la técnica y aprovechadas ulteriormente. Las proteínas adsorbidas al mineral de tres capas y los glicoalcaloides se

pueden desorber desde el agente adsorbente (el mineral de tres capas) mediante un deliberado desplazamiento de proteínas, por ejemplo mediante el uso de unas soluciones tamponadoras o de unas soluciones tamponadoras altamente salinas. En este caso, es ventajoso que para la desorción de las fracciones individuales se emplee en cada caso un tampón o un tampón altamente salino con un valor del pH, que está situado de manera preferida en 1 unidad, de manera preferida en 0,8 unidades, de manera aún más preferida en 0,6 unidades, de manera especialmente preferida en 0,5 unidades y de manera asimismo especialmente preferida en 0,4 unidades, por encima del punto isoeléctrico de la proteína que se ha de desorber (o del glicoalcaloide o respectivamente del compuesto que se ha de desorber).

El desprendimiento de los compuestos adsorbidos individuales con respecto del mineral de tres capas se puede efectuar, no obstante, fundamentalmente de cualquier manera que sea conocida por un experto en la especialidad como apropiada para la finalidad conforme al invento.

Constituye una ventaja especial del procedimiento conforme al invento el hecho de que los minerales de tres capas, que se emplean, se pueden regenerar y utilizar de nuevo después del proceso de separación. En este caso, los agentes inhibidores de proteasas se pueden obtener mediante el desprendimiento con respecto del agente adsorbente.

Una regeneración se puede efectuar por ejemplo mediante la puesta en contacto del mineral de tres capas con un tampón altamente salino (con NaCl 1 M o 2 M) o con un tampón alcalino. Se prefieren en el presente caso los tampones alcalinos, en particular los que tienen unos valores del pH de 8 - 14, de manera preferida de 9 a 13 y de manera sumamente preferida de 10 a 12. Unos tampones preferidos son en este contexto el de CAPS 100 M (de pH 11), así como el de fosfato 100 mM (de pH 12). La posibilidad de la regeneración es especialmente ventajosa, cuando el mineral de tres capas se emplea en el procedimiento conforme al invento en un empaquetamiento en columna.

#### **Parte de método**

Las propiedades físicas del agente adsorbente se determinaron con los siguientes procedimientos

##### Superficie específica según BET/volumen de poros según las normas BJH y BET:

La superficie específica y el volumen de poros se determinaron con un porosímetro de nitrógeno totalmente automático de la entidad Micromeritics tipo ASAP 2010.

La muestra se enfría en un alto vacío a la temperatura del nitrógeno líquido. Seguidamente, se añade dosificadamente nitrógeno de manera continua a las cámaras de muestra. Mediante la averiguación de la cantidad adsorbida del gas en función de la presión, se determina a una temperatura constante una isoterma de adsorción. En una compensación de la presión se elimina escalonadamente el gas de análisis y se registra una isoterma de desorción.

Para la determinación de la superficie específica y de la porosidad según la teoría de BIT se evalúan los datos de acuerdo con la norma DIN 66131.

El volumen de poros se determina además a partir de los datos de medición mediante aplicación del método de BJH (véase la referencia de I.P. Barret, L.G. Joiner, P.P. Haienda, J.Am.Chem.Soc. 73, 1991, 373). En el caso de este procedimiento se toman en cuenta también los efectos de una condensación capilar. Los volúmenes de poros de unos determinados intervalos de magnitudes de volumen se determinan mediante la suma de unos volúmenes de poros incrementales, que se obtienen a partir de la evaluación de la isoterma de adsorción según BJH. El volumen de poros global según el método de BJH se refiere a unos poros que tienen un diámetro de 1,7 a 300 nm.

##### Contenido de agua:

El contenido de agua de los productos se determina a 105 °C mediante utilización del método DIN/ISO-787/2.

##### Análisis de silicatos:

###### (a) Disgregación de una muestra

Este análisis se basa en la disgregación total de la arcilla en bruto o respectivamente del correspondiente producto. Después de la disolución de los materiales sólidos, los componentes individuales se analizan y cuantifican con unos métodos de análisis convencionales específicos, tales como p.ej. el de ICB.

Para la disgregación de la muestra se muelen finamente aprox. 10 g de la muestra que se ha de investigar y se secan durante 2 - 3 horas en una estufa de desecación a 105 °C hasta la constancia de peso. Aprox. 1,4 g de la muestra secada se introducen en un crisol de platino y se determina la cantidad pesada inicial de la muestra hasta

una exactitud de 0,001 g. Después de esto, la muestra se mezcla en el crisol de platino con la cantidad ponderal 4 hasta 6 veces mayor de una mezcla de carbonato de sodio y carbonato de potasio (1 : 1 ). La mezcla se coloca con el crisol de platino en un horno de Simon Müller y se funde durante 2 - 3 horas a 800 - 850 °C. El crisol de platino con la masa fundida se saca desde el horno con una pinza de platino y se deja reposar para que se enfríe. La masa fundida enfriada se enjuaga con un poco de agua destilada en una cacerola y se mezcla con precaución con un ácido clorhídrico concentrado. Después de haberse terminado el desprendimiento de gases, la solución se concentra por evaporación hasta sequedad. El residuo se recoge de nuevo en 20 ml de un ácido clorhídrico concentrado y se concentra de nuevo por evaporación hasta sequedad. La concentración por evaporación con ácido clorhídrico se repite todavía una vez más. El residuo se humedece inicialmente con aprox. 5 - 10 ml de ácido clorhídrico (al 12 %), se mezcla con aprox. 100 ml de agua destilada y se calienta. El SiO<sub>2</sub> insoluble se separa por filtración, el residuo se lava tres veces con ácido clorhídrico caliente (al 12 %) y luego se lava con agua caliente (destilada), hasta que el agua del material filtrado esté exenta de cloruros.

(b) Determinación de los silicatos

El SiO<sub>2</sub> se incinera con el filtro y se pesa.

(c) Determinación de aluminio, hierro, calcio y magnesio

El material filtrado, que se ha reunido en el caso de la determinación del silicato, se transfiere a un matraz aforado con una capacidad de 500 ml y se completa con agua destilada hasta la marca de calibración. A partir de esta solución las determinaciones del aluminio, hierro, calcio y magnesio se llevan a cabo mediante un FAAS.

(d) Determinación de potasio, sodio y litio

500 mg de la muestra seca se pesan inicialmente en una cubeta de platino con una exactitud de 0,1 mg. Después de esto, la muestra se humedece a fondo con aprox. 1 - 2 ml de agua destilada y con 4 gotas de ácido sulfúrico concentrado. A continuación, se concentra por evaporación hasta sequedad en un baño de arena con aprox. 10 - 20 ml de HF concentrado. Finalmente, se humedece con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora en forma de humos hasta sequedad sobre la placa de un horno. Después de una breve calcinación de la cubeta de platino se añaden aprox. 40 ml de agua destilada y 5 ml de ácido clorhídrico (al 18 %) y la mezcla se hierve. La solución obtenida se transfiere a un matraz aforado con una capacidad de 250 ml y se completa con agua destilada hasta la marca de calibración. A partir de esta solución, se determinan los contenidos de sodio, potasio y litio mediante un EAS.

Pérdida por calcinación:

En un crisol de porcelana pesado y calcinado, provisto de una tapa, se pesa inicialmente aprox. 1 g de la muestra seca con una exactitud de 0,1 mg y se calcina durante 2 h a 1.000 °C en un horno de mufla. Después de esto, el crisol se enfría en un aparato desecador y se pesa.

Capacidad de intercambio de iones:

Para la determinación de la capacidad de intercambio de cationes, el material arcilloso que se ha de investigar se seca a lo largo de un período de tiempo de 2 horas a 105 °C. Después de esto, el material arcilloso seco se hace reaccionar bajo reflujo durante 1 hora con un exceso de una solución acuosa 2 N de NH<sub>4</sub>Cl. Después de un período de tiempo de reposo de 16 horas a la temperatura ambiente, se filtra, después de lo cual la torta del filtro se lava, se seca y se muele, y se determina según las instrucciones del fabricante el contenido de NH<sub>4</sub> en el material arcilloso mediante una determinación del nitrógeno (en un analizador de CHN "Vario-EL III" de la entidad Elementar en Hanau). La proporción y el tipo de los iones de metales intercambiados se determinan en el material filtrado mediante una espectroscopía de ICP.

Determinación del volumen del sedimento:

Un cilindro de medición graduado con una capacidad de 100 ml se llena con 100 ml de agua destilada. 2 g de la sustancia que se ha de medir se añaden lentamente y en porciones, en cada caso aproximadamente de 0,1 a 0,2 g, con una espátula sobre la superficie del agua. Después de haberse hundido una porción añadida, se añade la siguiente porción. Después de haber añadido los 2 g de la sustancia y de haberse hundido éstos hasta el fondo del cilindro de medición, el cilindro se deja reposar durante una hora a la temperatura ambiente. A continuación, con ayuda de la graduación del cilindro de medición se lee el nivel del volumen del sedimento en ml/2 g. Para la determinación del volumen del sedimento después de un almacenamiento durante 3 días en agua, se cierra la tampa de la muestra con una Parafilm<sup>®</sup> y se deja reposar durante 3 días a la temperatura ambiente sin sacudidas. Después de esto, se lee el volumen del sedimento con ayuda de la graduación del cilindro de medición.

Determinación del contenido de montmorillonita a través de la adsorción de azul de metileno

El valor de azul de metileno es una medida de la superficie interna de los materiales arcillosos.

a) Preparación de una solución de difosfato de tetrasodio

5 5,41 g del difosfato de tetrasodio se pesan inicialmente con una exactitud de 0,001 g en un matraz aforado con una capacidad de 1.000 ml y mediando sacudimiento se completa con agua destilada hasta la marca de calibración.

b) Preparación de una solución de azul de metileno al 0,5 %

10 En un vaso de precipitados con una capacidad de 2.000 ml se disuelven 125 g de azul de metileno en aprox. 1.500 ml de agua destilada. La solución se separa por decantación y se completa con agua destilada hasta 25 l.

15 0,5 g de una bentonita de ensayo húmeda con una superficie interna conocida se pesan inicialmente con una exactitud de 0,001 g en un matraz Erlenmeyer. Se añaden 50 ml de una solución de difosfato de tetrasodio y la mezcla se calienta durante 5 minutos hasta ebullición. Después de haberse enfriado a la temperatura ambiente se añaden 10 ml de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 molar y se añaden de 80 a 95 % del consumo final que es de esperar de la solución de azul de metileno. Con una barra de vidrio se recoge una gota de la suspensión y se deposita sobre un papel de filtro. Se forma una mancha de color azul negruzco con un halo incoloro. Entonces, se añade en porciones 1 ml de la solución de azul de metileno y se repite la prueba de la gotita. La adición se efectúa hasta que el halo se ha coloreado ligeramente de azul claro, es decir que la cantidad añadida de azul de metileno ya no es absorbida por la bentonita de ensayo.

c) Comprobación de unos materiales arcillosos

25 La comprobación del material arcilloso se lleva a cabo de igual manera que para la bentonita de ensayo. A partir de la cantidad consumida de la solución de azul de metileno se puede calcular la superficie interna del material arcilloso.

30 381 mg de azul de metileno/g de arcilla corresponden según este procedimiento a un contenido de 100 % de montmorillonita.

Determinación del residuo seco de tamizado

35 Aproximadamente 50 g del material arcilloso secado al aire, que se ha de investigar, se pesan inicialmente sobre un tamiz que tiene la correspondiente anchura de mallas. El tamiz se conecta con una aspiradora, que aspira todas las porciones, que son más finas que el tamiz, a través de una rendija de succión que gira por debajo del suelo del tamiz. El tamiz se cubre con una tapadera de material plástico y la aspiradora se pone en marcha. Después de 5 minutos se desconecta la aspiradora y mediante un pesaje diferencial se determina la cantidad de las porciones más gruesas que han quedado sobre el tamiz.

40 Determinación del residuo húmedo de tamizado

45 En primer lugar se prepara una suspensión al 5 % introduciendo con agitación una cantidad correspondiente del material arcilloso que se ha de investigar con aprox. 930 rpm (revoluciones por minuto) durante 5 minutos en agua. La suspensión se agita durante otros 15 minutos a aprox. 1.865 rpm y esta suspensión se vierte a través de un tamiz con la deseada anchura de mallas. El residuo se lava con agua corriente del grifo hasta que las aguas de lavado salgan transparentes. El tamiz con el residuo se coloca entonces durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos, con el fin de eliminar las porciones finas restantes. El residuo remanente se lava brevemente con agua corriente del grifo y se repite eventualmente el tratamiento con ultrasonidos, hasta que durante el tratamiento con ultrasonidos ya no pase ninguna sustancia fina más al agua. El tamiz se seca entonces hasta la constancia de peso. Para realizar el pesaje, el residuo que ha quedado sobre el tamiz se transfiere a una cubeta de porcelana que se ha pesado

Determinación del peso aparente

55 Un cilindro de medición cortado a la altura de la marcación de 1.000 ml se pesa. Luego se introduce de una vez la muestra que se ha de investigar mediante una tolva para polvo, de tal manera que por encima del extremo final del cilindro de medición se forme un cono a granel. El cono a granel se retira con ayuda de una regla, que se guía por encima de la abertura del cilindro de medición, y el cilindro de medición llenado se pesa de nuevo. La diferencia corresponde al peso aparente.

60 Difractometría de rayos X (en unas fases mixtas de esmectita y gel de sílice)

65 1 hasta 2 g de la muestra se muelen a mano en un mortero de ágata y luego se tamizan a través de un tamiz con una anchura de mallas de 20 µm. Eventualmente se repite el proceso de molienda hasta tanto que toda la muestra haya pasado por el tamiz. Para las mediciones se utilizó un difractómetro de rayos X Siemens D5000. Se utilizaron las siguientes condiciones de medición:

Soporte de muestras	De un material sintético, "top loading" (con carga por arriba, $\varnothing = 25$ mm)
Espesor de la capa de polvo	1 mm
Fuente de rayos X	Cu K $\alpha$ : 40 kV/40mA
Ángulo de difracción	2 - 80 ° (2 $\Theta$ )
Tiempo de medición	3 segundos por etapa
Rendija	Unos diafragmas divergentes primarios y secundarios con unas anchuras de rendija de 1 mm

5 La evaluación cualitativa de los difractogramas, es decir la asignación de las fases minerales, se efectúa con ayuda del programa obtenible comercialmente "EVA" de Bruker AXS GmbH, Karlsruhe, correspondientemente a la publicación de Brindley y Brown (1980): "Crystal Structures of clay minerals and their X-ray identification" [Estructuras cristalinas de minerales arcillosos y su identificación por rayos X]; Mineralogical Society n° 5, 495.

10 La evaluación cuantitativa se efectuó de acuerdo con el procedimiento de Rietveld mediante utilización del programa de ordenador AutoQuan de la entidad Seifert GE Inspection Technologies GmbH, Ahrensburg, Alemania. Para la determinación de la proporción de la fase amorfa se utilizó zinquita como patrón interno. Para la corrección del fondo se utilizó un polinomio de cuarto grado en un intervalo de ángulos de 4 a 80 ° (2 $\Theta$ ).

15 Difractometría de rayos X para la determinación del contenido de minerales secundarios de la muestra comparativa (una bentonita de calcio)

Las radiografías para este patrón de muestra se realizaron en un difractómetro de alta resolución de la entidad Phillips (X'-Pert-MPD(PW 3040), que se había equipado con un ánodo de Cu. El contenido de minerales secundarios del silicato estratificado (p.ej. una bentonita) se determinó con unas mediciones a partir de una serie de concentraciones con un silicato de capas exento de minerales secundarios, que había sido enriquecido con el correspondiente mineral secundario. Para esto, para los minerales se emplearon unos denominados patrones de NIST NIST (adquiridos del National Institute of Standards and Technology, 100 Bureau Drive, Stop 2300, Gaithersburg, MD 20899-2300). Para cada mineral se determinó la intensidad (altura) de reflejo del reflejo más intenso como una función del contenido del respectivo mineral secundario en el material de referencia. A partir de estos datos, después de la determinación de la altura del mismo reflejo en la muestra desconocida, se puede calcular el contenido del correspondiente mineral secundario. Este procedimiento se ha de valorar como semicuantitativo.

### Figuras y Ejemplos

30 El procedimiento conforme al invento se va a describir más detalladamente a continuación con ayuda de las Figuras y los Ejemplos que se describen. En este caso, se ha de resaltar que tanto las Figuras como también los Ejemplos poseen solamente un carácter ilustrativo y que no restringen de ningún modo el alcance del invento.

Allí muestran:

- 35 La Fig. 1: la composición porcentual de un agua de vegetación de patatas industrial
- La Fig. 2: una recopilación acerca de las clases de agentes inhibidores de proteasas que están contenidas en el agua de vegetación de patatas
- 40 La Fig. 3: la fórmula estructural de la  $\alpha$ -solanina
- La Fig. 4: la fórmula estructural de la  $\alpha$ -chaconina
- 45 La Fig. 5: la adsorción de proteínas procedentes del agua de vegetación de patatas en los minerales de tres capas ensayados, agente adsorbente 1 (una fase mixta de un gel de sílice y una esmectita), agente adsorbente 2 (bentonita 1), agente adsorbente 4 (saponita 1), agente adsorbente 5 (tierra de batán 1), agente adsorbente 6 (tierra de batán 2), agente adsorbente 7 (tierra de batán 3) y agente adsorbente 3 (bentonita 2) (por una SDS Page)
- 50 La Fig. 6: el contenido de glicocalcoides en un agua de vegetación de patatas y en los materiales sobrenadantes después de la adsorción a los diferentes minerales de tres capas. (Valores promedios de la determinación doble)

55 Caracterización de los minerales arcillosos y de las tierras de batán que se emplean para los procesos de separación en un agua de vegetación de patatas, tal como se emplean en los Ejemplos:

Con el fin de determinar las propiedades relevantes de los minerales arcillosos para un empleo para la separación de solanina y para la separación de las fracciones proteínicas en el agua de vegetación de patatas, se emplearon para los procesos de separación los siguientes minerales arcillosos y unas tierras de batán producidas a partir de ellos.

5 En el caso del agente adsorbente 1 se trata de una fase mixta a base de una montmorillonita y un gel de sílice natural. Para la determinación de los contenidos de las fracciones minerales individuales - para el caso de este agente adsorbente se realizó una evaluación por difracción de rayos X mediando utilización del análisis de Rietveld. Los resultados se representan en la Tabla 3. Los datos físicos característicos para este agente adsorbente se han reproducen en la Tabla 1: la proporción del material amorfo es de 34 % en peso.

10 En el caso del agente adsorbente 2 se trata de una bentonita de sodio y calcio natural con una alta capacidad de intercambio de cationes.

15 En el caso del agente adsorbente 3 se trata de una bentonita de calcio con una capacidad de intercambio de cationes desde mediana hasta baja.

20 En el caso del agente adsorbente 4 se trata de una saponita en la forma con calcio, que se presenta en la naturaleza.

En el caso de los agentes adsorbentes 5 y 6 se trata de unas bentonitas (unas tierras de batán) disgregadas en condiciones ácidas, que se habían obtenido mediante una cocción de una montmorillonita con un ácido.

25 En el caso del agente adsorbente 7 se trata de una denominada SMBE (acrónimo del inglés "surface modified bleaching earth" [= tierra de batán modificada superficialmente]). Ésta se había obtenido mediante una carga del agente adsorbente 1 con 5 % en peso de ácido sulfúrico.

30 Los datos físicos característicos respecto a los agentes adsorbentes se exponen en la Tabla 1. La Tabla 2 muestra las composiciones químicas, la Tabla 4 muestra los contenidos de minerales secundarios, determinados mediante difracción de rayos X mediando utilización de unas mediciones comparativas con unos patrones de NIST (véase la parte de método).

Tabla 1: Propiedades físicas de los agentes adsorbentes

Agente adsorbente	1	2	3	4	5	6	7
	Fase mixta de un gel de sílice y esmecita	Bentonita 1	Bentonita 2	Saponita 1	Tierra de batán 1	Tierra de batán 2	Tierra de batán 3
Capacidad de intercambio de cationes (meq/100 g)	52	105	59	49	38	38	48
Residuo seco de tamizado a 45 µm (%)	49	n.d.	n.d.	n.d.	41	40	53
Residuo seco de tamizado a 63 µm (%)	35	n.d.	max. 20	n.d.	31	29	41
Residuo seco de tamizado a 25 µm (%)	n.d.	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Peso aparente (g/l)	292	600	750	713	570	550	380
Adsorción de azul de metileno (mg/g de muestra)	106	500	247	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Contenido de agua (%)	8	12,2	9 ± 4	9 ± 3	~ 10	~ 10	~ 10
pH (al 10 % en peso en agua)	7,9	10,0	8,6	8,5	2,2-39	2,2-48	2-4
Superficie específica según BET (m <sup>2</sup> /g)	208,4	80	65	65	190	270	190
Volumen de poros acumulativo (según BJH) para un diámetro de poros de 1,7 - 300 nm (cm <sup>3</sup> /g)	0,825	0,13	0,103	0,12	n.d.	0,41	n.d.
Diámetro promedio de poros (según BJH) (nm)	16,4	9,9	9,6	6,1	n.d.	5,9	n.d.
Volumen del sedimento o respectivamente de hinchamiento (ml/2 g)	5,5	15	6	5	3,0	2,0	4,0

n.d. = no determinado

La composición de los agentes adsorbentes 1 hasta 3 utilizados conforme al invento así como de la bentonita de calcio empleada como comparación se indica en la Tabla 4.

Tabla 2: Composición de los agentes adsorbentes

Agente adsorbente	1	2	3	4	5	6	7
	Fase mixta de un gel de sílice y esmectita	Bentonita 1	Bentonita 2	Saponita 1	Tierra de batán 1	Tierra de batán 2	Tierra de batán 3
SiO <sub>2</sub>	70,6	59,6	57,9	52	64	66,8	70,2
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,8	3,6	4,9	1,9	4,3	3,7	2,8
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	9,8	17,2	18,3	6,6	15,2	14,2	9,4
MgO	4,1	6,7	3,4	26	2,8	2,3	2,5
CaO	1,4	2,4	3,1	1,1	1,4	1,1	2,3
K <sub>2</sub> O	1,5	0,51	1,8	1,4	2,9	2,2	1,5
Na <sub>2</sub> O	0,26	1,7	0,7	0,32	1	0,8	0,4
TiO <sub>2</sub>	0,25	0,27	--	0,25	--	--	0,3
SO <sub>3</sub>	--	--	--	--	--	--	--
GV (a 1.000°C)	7,9	7	8,9	9,5	7,6	8	9,5

5 Además, los agentes adsorbentes 1 y 2 utilizados conforme al invento se investigaron más exactamente por difracción de rayos X en cuanto a su composición mineral. La evaluación se efectuó tal como se ha descrito más arriba. La composición mineral de los agentes adsorbentes 1 y 2 así como de la bentonita de calcio utilizada como comparación se recopila en las Tablas 5a y 5b.

10 Tabla 3: Composición mineral del agente adsorbente 1, determinada mediante evaluación de unos difractogramas de rayos X mediante utilización del análisis de Rietveld

Fase mineral	Agente adsorbente 1 (una fase mixta de un gel de sílice y esmectita)
Esmectita (% en peso)	40
Illita / muscovita (% en peso)	trazas
Caolinita (% en peso)	n.d.
Sepiolita (% en peso)	11
Cuarzo (% en peso)	trazas
Ortoclasa (% en peso)	12
Plagioclasa (diferente) (% en peso)	3
Calcita (% en peso)	trazas
Material amorfo	34

15 En la siguiente Tabla 5 b se exponen los contenidos de minerales secundarios que se han determinado a partir de unas mediciones con rayos X (véase la descripción de los métodos):

Tabla 4: Composición mineral del material utilizado como comparación (siempre y cuando que esté presente, sin el agente adsorbente 1).

Fase mineral	Agente adsorbente 2 (bentonita 1)	Agente adsorbente 3 (bentonita 2)	Agente adsorbente (saponita 1)	Agente adsorbente 5 (tierra de batán 1)	Agente adsorbente 6 (tierra de batán 2)	Agente adsorbente 7 (tierra de batán 3)
Caolinita (% en peso)	-	1 - 2	-	-	-	-
Cuarzo (% en peso)	0,5	6 - 9	2 - 3	8	6 - 7	1 - 2
Feldespato (% en peso)	-	1 - 4	2 - 3	2 - 3	2	2
Mica (% en peso)	-	1 - 6	-	2 - 3	2 - 3	1 - 2
Calcita (% en peso)	< 1	-	0,5 - 1	-	-	-
Otros minerales (% en peso)	-	5 - 10	-	-	-	-

Ejemplo 1

Adsorción de proteínas de patatas a diferentes minerales de tres capas

5 Se investigó en dependencia del valor del pH la adsorción de un agua de vegetación de patatas a los materiales agente adsorbente 1 (una fase mixta de un gel de sílice y esmectita), agente adsorbente 2 (bentonita 1), agente adsorbente 4 (saponita 1), agente adsorbente 7 (tierra de batán 3) y agente adsorbente 3 (bentonita 2).

Realización:

- 10
- 100 mg del agente adsorbente
  - 2,5 ml de un agua de vegetación de patatas diluida y tamponada (2.400 µl de un tampón 50 mM + 100 µl de un agua de vegetación de patatas)
- 15
- tampón: acetato (pH 4 y pH 5), MES (pH 6), HEPES (pH 7), Tris (pH 8 y pH 9)
  - incubar durante 2 horas en un mezclador de cabezal superior
- 20
- separar por centrifugación el material, materiales sobrenadantes: por SDS-PAGE (geles al 10 %, tinción con plata)

Los geles se representan en la Figura 5.

25

A unos pH de 4 y 5 se adsorben por estos agentes adsorbentes todas las proteínas que están contenidas en el agua de vegetación de patatas. A un pH de 7-9 tiene lugar una adsorción selectiva de los agentes inhibidores de proteasas, (pH 6: adsorción completa de los agentes inhibidores de proteasas, adsorción parcial de las patatinas) cuando como agentes adsorbentes se emplean unas bentonitas, unas tierras de batán o unas fases mixtas de esmectitas y unos geles de sílice. La saponita adsorbe todas las fracciones proteínicas en todas las condiciones empleadas y en todos los valores del pH empleados, y por lo tanto no es apropiada para su separación o respectivamente un empobrecimiento de las proteínas menores de patatas y de las polifenol oxidasas. Esto es provocado probablemente por su pequeña capacidad de intercambio de cationes.

30

35 Ejemplo 2

Empobrecimiento de los glicocalcoides a partir de un agua de vegetación de patatas

40 Un agua de vegetación de patatas diluida (5 ml + 5 ml de tampón) se adsorbió a un pH de 8" (Tris 100 mM) a los materiales, agente adsorbente 3 (bentonita 2), agente adsorbente 5 (tierra de batán 1) así como agente adsorbente 6 (tierra de batán 2). Se utilizaron 5 g del material correspondiente.

45 Después de haberse efectuado la incubación de los materiales con el agua de vegetación de patatas y de haber separado por centrifugación agente adsorbente, en el material sobrenadante, después de una extracción con ácido acético y de una extracción en fase sólida, se determinó el contenido de glicocalcoides mediante una analítica por HPLC.

En los tres agentes adsorbentes se pudo comprobar un efecto de empobrecimiento de más que un 90 %:

50 Agente adsorbente 3 (bentonita 2): 93,9 %

Agente adsorbente 5 (tierra de batán 1): 96,4 %

La bentonita activada en condiciones ácidas CEC [agente adsorbente 6 (la tierra de batán 2)]: 96,5 %

55 Los resultados se han representado también en la Fig. 5.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la separación de proteínas vegetales que comprende la etapa de
- 5 a) poner en contacto una solución proteínica con un mineral de tres capas, que se escoge entre el conjunto que se compone de los minerales de tres capas producidos de una manera natural o artificial, que pueden ser tratados previamente en condiciones ácidas o alcalinas y/o que contienen una cierta proporción de un gel de sílice, poseyendo el mineral de tres capas una capacidad de intercambio de cationes de por lo menos 50 meq/ 100 g del mineral de tres capas.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, habiéndose escogido el mineral de tres capas entre el conjunto que se compone de unos silicatos de capas esmectíticos y no esmectíticos así como unas mezclas de éstos.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, habiéndose escogido los silicatos en capas esmectíticos entre el conjunto que se compone de bentonitas, beidelitas, saponitas, montmorillonitas, hectoritas y estevensitas, y habiéndose escogido los silicatos en capas no esmectíticos entre el conjunto que se compone de las vermiculitas.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo los minerales de tres capas, además de esto, una o varias fase(s) amorfa(s) y uno o varios mineral(es) secundario(s), que se escoge(n) entre el conjunto que se compone de cuarzo, cristobalita, feldespato, calcita, dolomita y sus mezclas.
- 25 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, poseyendo la solución proteínica un valor del pH de 5,0 a 9,0.
- 30 6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, poseyendo el mineral de tres capas un tamaño medio de partículas de 1 µm a 1,5 mm.
- 35 7. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, tratándose en el caso de la solución proteínica de un agua de vegetación de plantas.
- 40 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, tratándose en el caso del agua de vegetación de plantas de un agua de vegetación de patatas.
9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente las etapas de
- b) separar la solución proteínica puesta en contacto según la etapa a) y el mineral de tres capas;
- c) poner en contacto el mineral de tres capas de la etapa b) con una solución tamponadora o con una solución tamponadora altamente salina.

**Fig. 1**

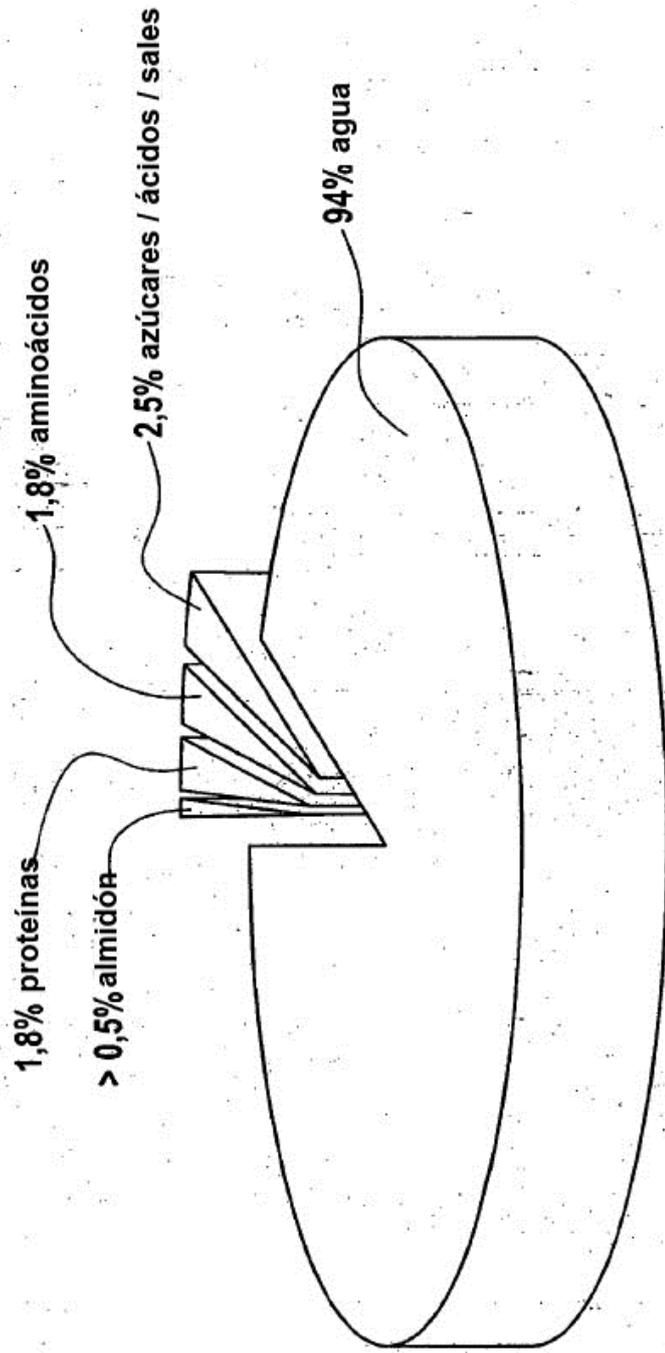


Fig. 2

Clase	Tipo de agente inhibidor	PM [kDa]	IEP	Proporción de la proteína global [%]
Agente inhibidor de proteasa 1 (PI-1)	PI de serina pentamérico	cinco promotores de iso-agentes inhibidores 7,0 - 8,0	5,1- 7,8	4,5
Agente inhibidor de proteasa 1 (PI-1)	PI de serina dimérico	dos subunidades 10,2	5,5 - 6,9	22
Agentes inhibidores de cisteinil proteasas (PCPI)	nueve diferentes PI de cisteína	20,1 - 22,8	5,8 - < 9,0	12
Agentes inhibidores de aspartil proteasas (PAPI)	seis diferentes PI de aspartato	19,9 - 22,0	6,2 - 8,7	6
Agentes inhibidores de proteasa de Kunitz (PKPI)	PI de Kunitz	dos subunidades 20,2	8,0 - < 9,0	4
Otros agentes inhibidores de serina proteasas		21,0 21,8 12,3	7,5 - 8,8	1,5
Agentes inhibidores de carboxi peptidasas (PKPI)	Agente inhibidor de carboxi peptidasa	4,1 - 4,3	n. a.	1

Fig. 3

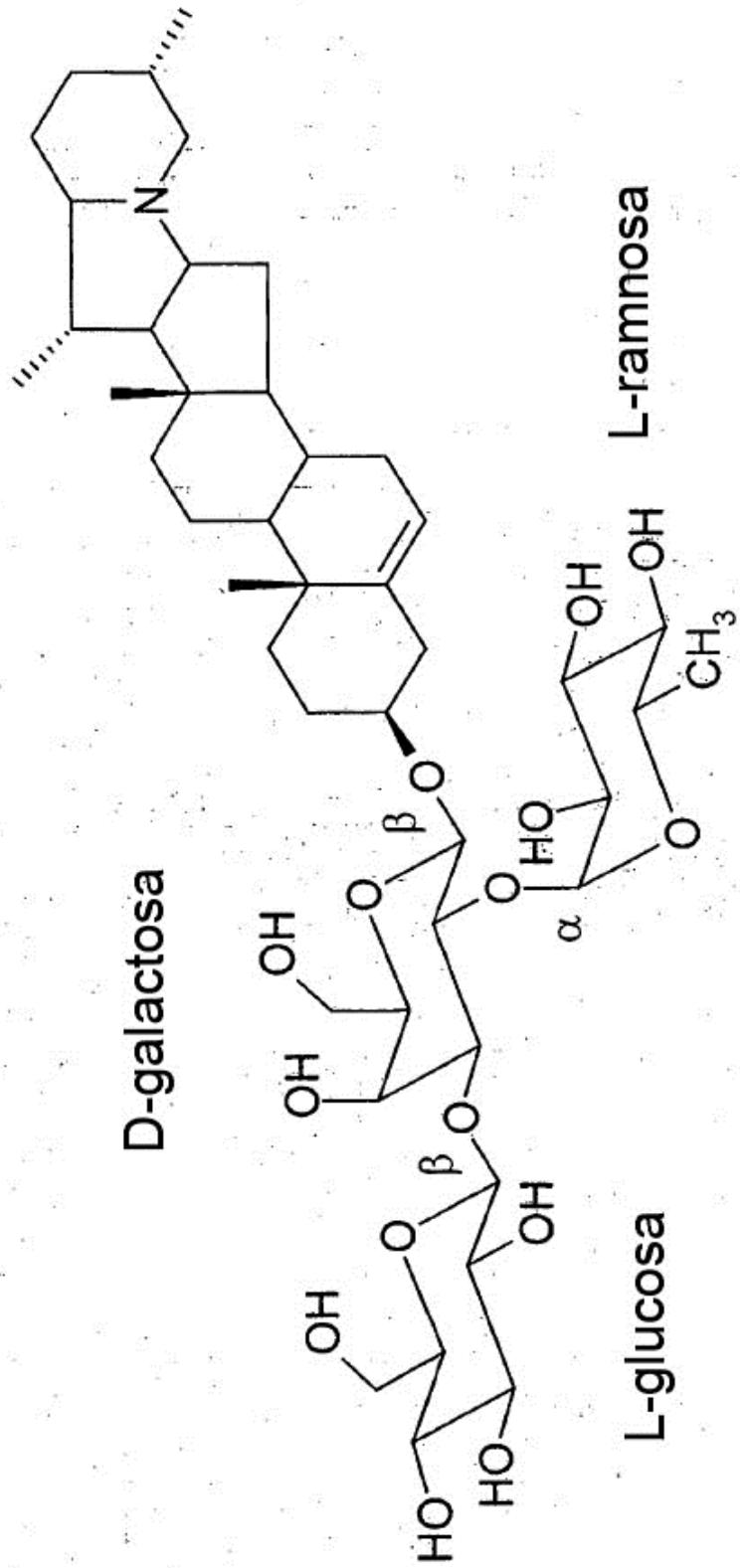
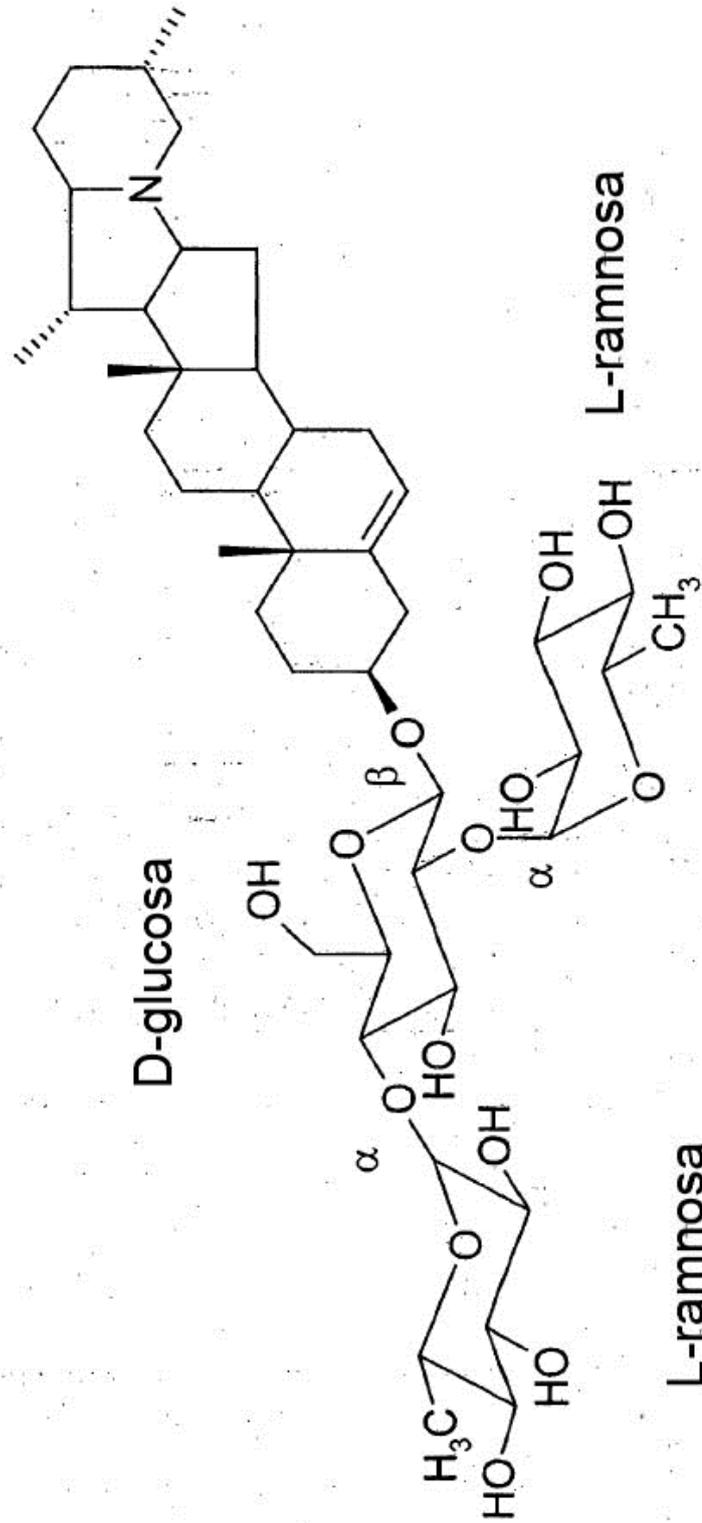


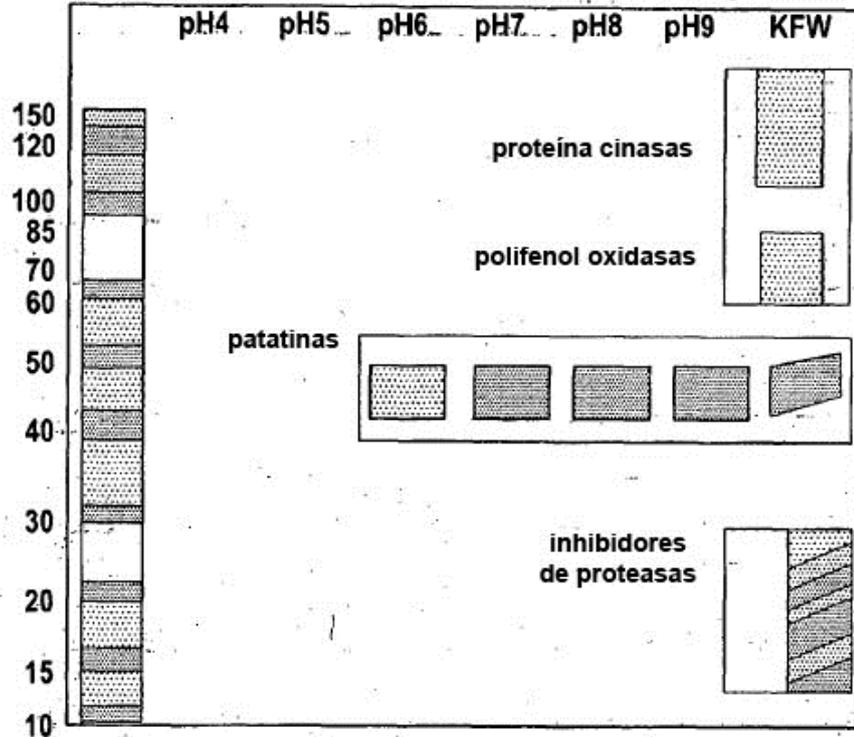
Fig. 4



**Fig. 5** Agente adsorbente,1

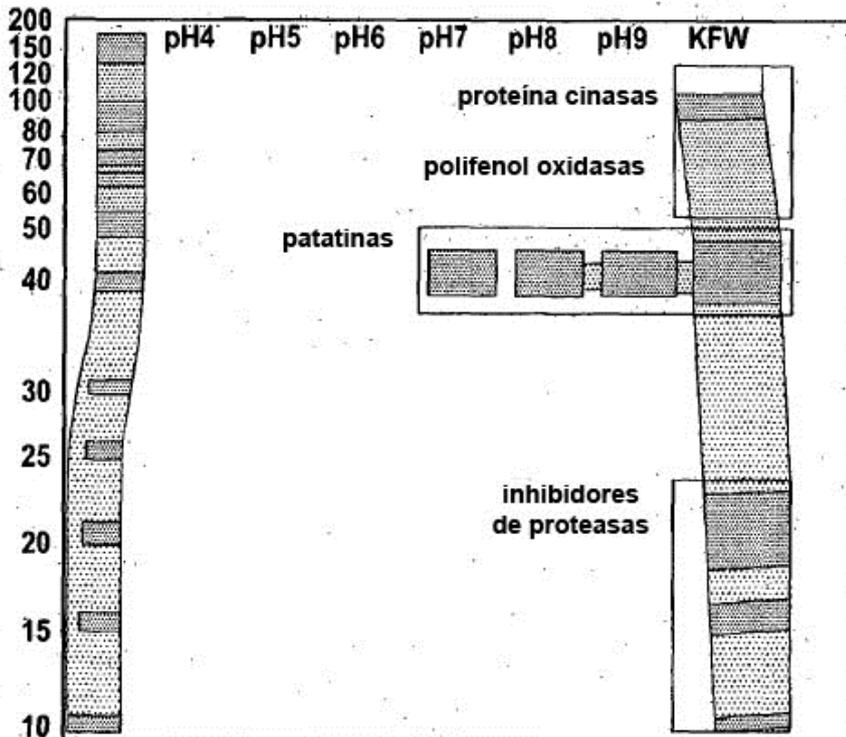
Fase mixta de gel de sílice y esmectita

**A)**



Agente adsorbente 2  
(Bentonita 1)

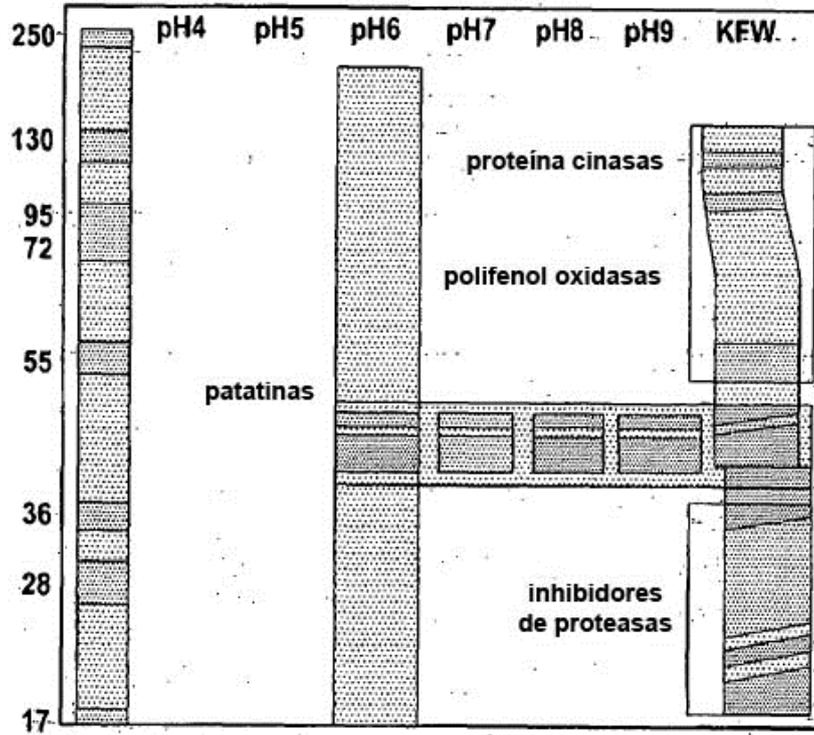
**B)**



**Fig. 5**

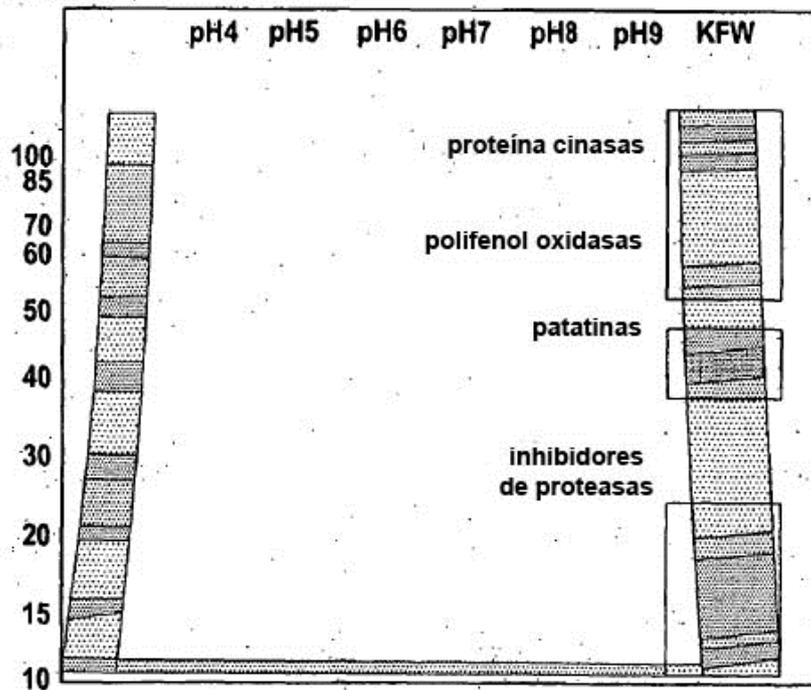
Agente adsorbente 3  
(Bentonita 2)

**C)**



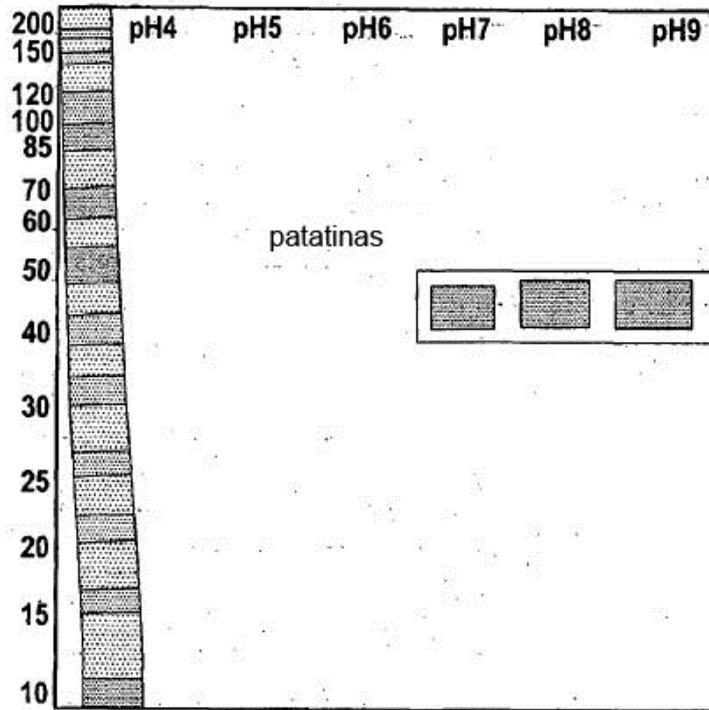
Agente adsorbente 4  
(Saponita 1)

**D)**



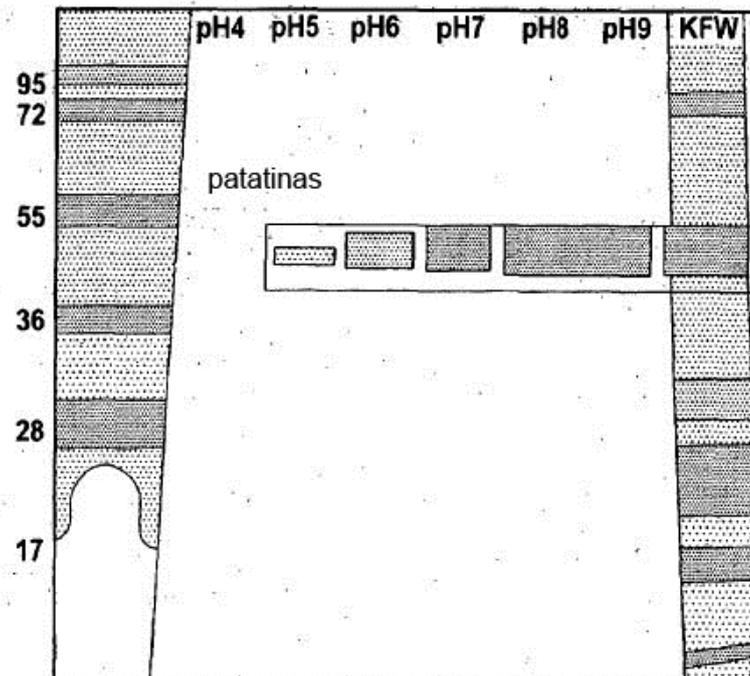
**Fig. 5** Agente adsorbente 5  
(Tierra de batán 1)

**E)**



Agente adsorbente 6  
(Tierra de batán 2)

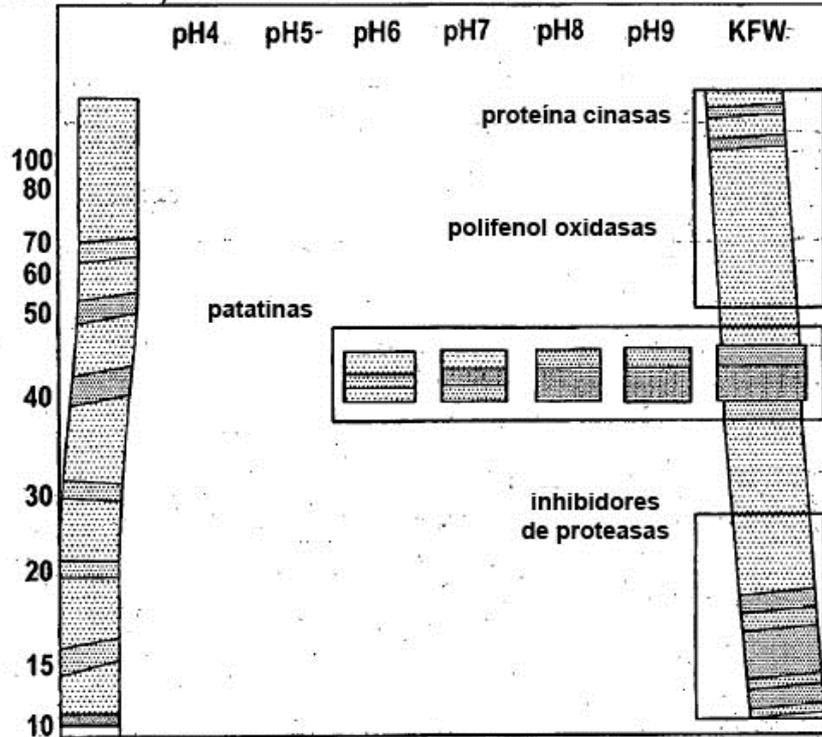
**F)**



**Fig. 5**

Agente adsorbente 7  
(Tierra de batán 3)

**G)**



**Fig. 6**

