

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 655**

51 Int. Cl.:

A23J 1/14 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

A23J 3/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2012 E 12733111 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2736351**

54 Título: **Aislamiento de proteínas a partir de semillas oleaginosas**

30 Prioridad:

28.07.2011 EP 11175743

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

06.04.2016

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**WNUKOWSKI, PIOTR;
SMOLDERS, GERARDUS JOHANNES
FRANCISCUS y
VEERMAN, CECILE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 565 655 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

Aislamiento de proteínas a partir de semillas oleaginosas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para aislar proteínas a partir de semillas oleaginosas tales como semilla de colza, semilla de girasol, de coco o de soja.

Antecedentes de la invención

10 El aceite presente en las semillas oleaginosas se extrae habitualmente con hexano. Sin embargo, la combinación de proceso de extracción y eliminación de disolventes puede dar lugar a la desnaturalización de las proteínas. Esto conduce a un estado conformacional en el que las proteínas no muestran una funcionalidad tecnológica necesaria para el uso de proteínas en una amplia gama de aplicaciones alimentarias. Por otra parte, este disolvente se ha convertido en el foco de interés con respecto a la seguridad y los efectos ambientales (el hexano ha sido catalogado como contaminante peligroso del aire).

15 Para extraer la fracción proteica de semillas oleaginosas, se han empleado varias técnicas de extracción. Se puede mencionar la extracción con agua o álcalis, NaCl o disoluciones de hexametáfosfato de sodio. Un proceso de extracción alcalina conduce a los rendimientos más elevados, pero tiene el riesgo de oscurecimiento del producto y un impacto negativo en el sabor o el olor.

20 Como ejemplo, se comentará con más detalle la semilla de colza. La semilla de colza es una de las semillas oleaginosas más importantes en el mundo (la número 3 después del aceite de soja y de palma). La semilla de colza contiene altas cantidades de aceite (30-45%) y proteínas (20-30%). Sin embargo, también están presentes en la semilla de colza compuestos anti-nutricionales también tales como glucosinolatos, polifenoles y ácido fítico. La Tabla 1 muestra un intervalo típico de estos componentes en las semillas de colza:

Tabla 1: Compuestos anti-nutricionales en semilla de colza

Glucosinolatos	10-20 $\mu\text{mol/kg}$
Sinapina	1-1,5% (compuestos fenólicos totales (1-3%))
25 Ácido fítico	1-2%

Para la extracción de proteína a partir de semillas de colza tienen que abordarse las siguientes cuestiones:

- 30 - La presencia de compuestos fenólicos que puede dar lugar a un color oscuro después del procesamiento y un aumento en la intensidad del sabor y el olor. Canola (semillas de colza) contiene aproximadamente 10 a 30 veces la cantidad de compuestos fenólicos que se encuentran en la soja (tales como sinapina y taninos). Tras la oxidación, esos compuestos dan lugar a un color oscuro. Condiciones alcalinas especialmente fuertes conducen a una rápida oxidación de compuestos fenólicos a las denominadas quinonas que luego pueden reaccionar con proteínas (proporcionando un color oscuro). Estos compuestos fenólicos pueden unirse en parte a proteínas (véase la patente de EE.UU. 6905713).
- 35 - La presencia de fitato que puede actuar como agente quelante en el cuerpo humano y la reducción de la biodisponibilidad de algunos metales.
- La presencia de glucosinolatos. La hidrólisis de glucosinolatos podría dar lugar a productos tóxicos. Los glucosinolatos disminuyen también la palatabilidad de la harina de colza.

Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un procedimiento mejorado para la extracción y el aislamiento de proteínas a partir de harina de semillas oleaginosas, por lo que este aislamiento tiene lugar al añadir una cantidad suficiente de disolvente hidrosoluble tal como etanol a una disolución acuosa que contiene proteínas extraídas de la harina, con lo cual la proteína presente precipita. Para preservar el nacimiento de las proteínas, la harina utilizada para la extracción de proteínas procede preferiblemente de semillas oleaginosas no tratadas con hexano.

45 Opcionalmente este precipitado se puede purificar adicionalmente mediante lavado con el disolvente hidrosoluble tal como etanol. El aislado de proteína se puede secar utilizando un método de secado adecuado.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un procedimiento para aislar proteínas nativas de la harina de semillas oleaginosas o de la torta de aceite de semillas oleaginosas, que comprende las siguientes etapas:

- extraer la harina con agua para obtener una disolución acuosa;

- concentrar el extracto acuoso para formar una disolución acuosa que comprende 5 a 30% en peso de proteína, preferiblemente 10 a 30% en peso de proteína;
- añadir un disolvente hidrosoluble a la disolución acuosa concentrada para obtener un precipitado de proteínas, en donde el disolvente hidrosoluble es etanol, etanol que se añade hasta un contenido final entre 60 y 80% en vol; y
- separar el precipitado de proteínas de la fracción líquida.

Preferiblemente, el procedimiento de la invención comprende una etapa adicional de lavar el precipitado de proteínas. El procedimiento de la invención proporciona opcionalmente la etapa adicional de secar el precipitado de proteínas. Ventajosamente, en el procedimiento de la invención, después de la etapa de extracción y antes de la adición del disolvente hidrosoluble, la disolución acuosa o la disolución acuosa concentrada se somete a diafiltración, preferiblemente mediante el uso de UF (ultrafiltración). Preferiblemente hidratos de carbono solubles, glucosinolatos o sus derivados, fitatos o compuestos polifenólicos (o fenólicos) o una combinación de uno o más de estos compuestos se separan de la disolución acuosa o disolución acuosa concentrada. De acuerdo con una realización de la invención, la diafiltración tiene lugar antes, durante o después de concentrar el extracto acuoso. La harina utilizada en el procedimiento de la invención puede ser, por ejemplo, semilla de colza, girasol o harina de soja. Ventajosamente, la proteína aislada de la invención tiene un mayor grado de proteína nativa que la proteína derivada de harina tratada con hexano o métodos de extracción del estado de la técnica, lo cual conduce a una mejor funcionalidad tecnológica para la proteína aislada de la invención. Esta funcionalidad tiene ventajas en el uso de proteínas en una amplia gama de aplicaciones alimentarias.

La presente invención también proporciona una proteína de semilla oleaginosa nativa aislada o una composición de proteínas de semillas oleaginosas nativas, que comprende

- un contenido en proteínas de al menos 80% en peso, preferiblemente al menos 85% en peso, más preferiblemente al menos 90% en peso, y lo más preferiblemente entre 92 y 99% en peso (basado en materia seca);
- un contenido en etanol de menos de 0,2% en peso, preferiblemente menos de 0,1% en peso (basado en materia seca);
- un contenido en etanol de más de 0,001% en peso, preferiblemente más de 0,01% en peso (basado en materia seca); y
- un contenido fenólico de menos de 0,1% en peso, preferiblemente menos de 0,05% en peso, más preferiblemente menos de 0,02% en peso (basado en materia seca) expresado como equivalentes de ácido sinápico.

En el caso de que el aislado proteico o la composición de proteínas comprenda proteínas de semilla de colza, la composición comprende un contenido fenólico de menos de 0,1% en peso, preferiblemente menos de 0,05% en peso, más preferiblemente menos de 0,02% en peso (basado en materia seca) expresado como equivalentes de ácido sinápico. En el caso de que el aislado proteico o la composición de proteínas comprenda proteína de soja, la composición comprende un contenido fenólico de menos de 0,1% en peso, preferiblemente menos de 0,05% en peso, más preferiblemente menos de 0,02% en peso (basado en materia seca) expresado como equivalentes de ácido sinápico. En el caso de que el aislado proteico o la composición de proteínas comprenda proteína de girasol, la composición comprende un contenido fenólico de menos de 0,1% en peso, preferiblemente menos de 0,05% en peso, más preferiblemente menos de 0,02% en peso (basado en materia seca) expresado como equivalentes de ácido sinápico.

Preferiblemente, el aislado proteico o la composición de proteínas de la invención tienen un contenido en glucosinolatos de menos de 10 $\mu\text{mol/g}$, preferiblemente menos de 1 $\mu\text{mol/g}$ (basado en materia seca).

En general, el aislado proteico o la composición de proteínas de la invención tendrá un contenido en lípidos de 2 a 15% en peso, preferiblemente de 2 a 10% en peso, más preferiblemente de 2 a 8% en peso (basado en materia seca) en el caso de las semillas de colza o proteínas de girasol o de 2 a 20% en peso, más preferiblemente de 2 a 15% en peso (basado en materia seca) en el caso de la proteína de soja.

El aislado proteico o la composición de proteínas de la invención tendrá preferiblemente un contenido en fitato ($P \times 3,5$) de menos de 0,5% en peso, preferiblemente menos de 0,2% en peso (basado en materia seca). El aislado proteico o la composición de proteínas de la invención tendrá preferiblemente una solubilidad de al menos 30 NS%, preferiblemente al menos 50 NS%, más preferiblemente al menos 60 NS%, incluso más preferiblemente al menos 70 NS% y lo más preferiblemente al menos 75 NS%.

El aislado proteico o la composición de proteínas de la invención tiene preferiblemente un contenido en materia seca de al menos 70% en peso, preferiblemente al menos 80% en peso, más preferiblemente al menos 85% en peso, incluso más preferiblemente al menos 90% en peso, aún más preferiblemente al menos 91% en peso, incluso

todavía más preferiblemente tiene un contenido en materia seca de 92 a 99% en peso y lo más preferiblemente de 93 a 98% en peso.

5 El aislado proteico o la composición de proteínas de la invención comprenden preferiblemente de proteínas de semilla de colza, de girasol o de soja. En el caso de las semillas de colza, el aislado proteico o la composición de proteínas de la invención tendrá preferiblemente proteína 2S y proteína 12S presentes en una relación de 1:6 a 6:1, preferiblemente en una relación de 1:2 a 2:1 (peso/peso basado en materia seca).

Para tres aislados proteicos disponibles comercialmente, que no se produjeron de acuerdo con la invención, se midió una solubilidad de 69 NS%, 55 NS% y 67 NS%, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

10 Aislados o concentrados proteicos derivados de plantas o de semillas oleaginosas y previstos para el consumo comparten un problema principal para el procesador o formulador industrial, a saber, la presencia de factores anti-nutricionales tales como compuestos fenólicos que están presentes en el material de origen. Los compuestos
15 fenólicos son ubicuos en las semillas oleaginosas tales como soja, girasoles y semillas de colza y son responsables de la coloración, del sabor desagradable y del mal sabor de los aislados proteicos. Por lo tanto, existe la necesidad de separar o disminuir los compuestos no deseados tales como compuestos fenólicos a los niveles traza en los productos finales, especialmente en caso de un uso previsto para el consumo (humano).

20 Uno de los métodos para separar compuestos fenólicos de las formulaciones de proteínas es separarlos por lavado con disolventes hidrosolubles tales como metanol, acetona, etanol, etc. Son posibles diferentes enfoques, por ejemplo de tratamiento previo, tales como la aplicación de una etapa de lixiviación de disolvente antes de la extracción de las proteínas o de post-procesamiento, tales como el lavado de los aislados proteicos después de la extracción o el aislamiento.

25 El procedimiento de la invención proporciona la inclusión de tratamiento con disolvente después de la extracción de proteínas, pero antes de que tenga lugar el aislamiento de aislados proteicos. Los autores de la invención han encontrado que, en general, las proteínas pueden ser purificadas a partir de compuestos no deseados tales como compuestos fenólicos, al llevar la proteína a disolución acuosa. Preferiblemente, la proteína se purifica a partir de los compuestos de bajo peso molecular tales como hidratos de carbono y otros compuestos tales como parte de los compuestos fenólicos, presentes en el extracto bruto. Una purificación de este tipo se puede conseguir, por ejemplo, mediante la diafiltración en una UF (etapa de ultrafiltración). Los autores de la invención observaron que una parte sustancial de los compuestos fenólicos presentes en el extracto bruto se puede separar, por ejemplo, mediante UF, pero no todos. Todavía quedan algunos compuestos fenólicos dejan en el aislado proteico que no se pueden separar mediante, por ejemplo, diafiltración. En la bibliografía este fenómeno se ha observado con los girasoles.

35 Una posible explicación podría ser que estos compuestos fenólicos están embebidos en las estructuras terciarias de proteínas y están fijados a los epítopos hidrófobos de proteínas por fuerzas de atracción débiles. De acuerdo con la presente invención, las proteínas se mantienen preferiblemente como proteínas nativas o no desnaturalizadas mediante la selección de condiciones de procesamiento adecuadas antes de la aplicación de un disolvente. En general, es importante evitar que los compuestos fenólicos formen complejos irreversibles con proteínas. Estos complejos se pueden formar bajo determinadas condiciones tales como la presencia de oxígeno disuelto, un pH por encima de 8 y/o una temperatura elevada superior a 60 °C.

40 El aislamiento de proteínas de acuerdo con la invención se puede lograr mediante la adición del disolvente hidrosoluble etanol a la disolución acuosa, preferiblemente agitando al mismo tiempo. Las fuerzas de atracción entre los compuestos fenólicos y las proteínas se debilitarán por la presencia de etanol, lo que permite la disociación de los compuestos fenólicos de las cadenas de aminoácidos. Estos compuestos fenólicos se difundirán subsiguientemente en la mayor parte de la fase líquida. Para minimizar el riesgo para la desnaturalización irreversible, la temperatura se mantiene preferiblemente en el intervalo de 0 a 30 °C, preferiblemente de 0 a 20 °C.
45 Sin embargo, la presente invención no se sostiene o cae con esta explicación o hipótesis que sólo se plantea por autores de la invención para hacer las etapas del procedimiento fácilmente comprensibles en lugar de limitar el alcance de la presente invención.

50 Para conseguir este efecto, por ejemplo en proteínas de semilla de colza, el contenido de etanol en las aguas madres finales es entre 60 y 80% en volumen, más preferiblemente entre 65 y 75% en volumen. Si este contenido es significativamente menor, la purificación es menos eficaz. Si este contenido es mayor, la proteína podría someterse a una desnaturalización más rápida y la eficiencia de la purificación es menos óptima.

55 En el documento WO 02/060273 se sugirió que la exposición de la proteína de girasol a una disolución de etanol de más de 40% de etanol puede conducir a la desnaturalización de las proteínas. Los autores de la invención han encontrado, sorprendentemente, que la proteína de semilla de colza aislada en disolución de etanol al 70% vol. y posteriormente secada, permaneció siendo proteína nativa y conservaba sus propiedades funcionales relevantes para aplicaciones alimentarias tales como: capacidad de formación de espuma, solubilidad, capacidad de unión de agua, etc.

El procedimiento de la invención, cuando se utiliza para semillas de girasol, proporcionaba aislados proteicos con un alto rendimiento, una alta pureza y un bajo contenido de compuestos fenólicos. Este aislado proteico también mostró buenas propiedades funcionales, dando apoyo a la explicación o hipótesis de los autores de la invención.

5 A lo largo de la presente memoria descriptiva y de las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprenden" e "incluyen" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" e "incluyendo" se han de interpretar de forma inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden transmitir la posible inclusión de otros elementos o números enteros no recogidos específicamente, cuando el contexto lo permite.

10 Los artículos "un" y "una" se utilizan en esta memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

15 La semilla de colza (*Brassica napus*), también conocida como colza, colza de semillas oleaginosas, rapa, rappi, rapaseed (y en el caso de un grupo particular de cultivares, canola) es un miembro de floración de color amarillo brillante de la familia *Brassicaceae* (familia de la mostaza o de la col), (Wanasundara, 2011). Las proteínas presentes en la semilla de colza comprenden proteína 2S (proteína monomérica tal como la napina) y la proteína 12S (proteína hexamérica tal como cruciferina). En el kernel nativo está presente aproximadamente 7% en peso de proteína 2S, 2% en peso de proteína 7S y 12% en peso de proteína 12S.

20 El girasol cultivado (*Helianthus annuus L.*) es una de las 67 especies en el género *Helianthus* y es un miembro de la familia Compositae (Asteraceae). Las proteínas presentes en el girasol consisten en dos clases principales, la globulina 11S (tal como heliantinina) y las albúminas 2S de girasol. En las semillas de girasol aproximadamente el 60% de las proteínas consiste en proteína 11S, mientras que las albúminas 2S de girasol representan aproximadamente el 20% de las proteínas.

25 La soja contiene aproximadamente 40% de proteínas basado en materia seca (MS). Sobre la base de sus coeficientes de sedimentación, las proteínas de soja se pueden clasificar en fracciones 2S (13-18%), 7S (30-46%), 11S (36-53%) y 15S (0-4%). Las fracciones 11S y 15S consisten en glicina y polímeros de glicina, respectivamente. La mayoría de la fracción 7S es β -conglucininina. La fracción 2S consiste en inhibidores de tripsina de Bowman-Birk y Kunitz, citocromo c y α -conglucininina.

30 El procesamiento de la colza para la producción de aceite proporciona harina de colza o torta de aceite como subproducto de la molienda, la expulsión y, opcionalmente, extracción de aceite de colza de semillas oleaginosas y, en general, en forma de harina. Por "torta de aceite" se entiende el producto después de la molienda y la expulsión. Por "harina" se entiende al menos parte del aceite separado, por ejemplo por extracción, de la torta. La torta de aceite y el subproducto harina tiene un alto contenido en proteínas. Otras semillas de aceite dan una harina o una torta de aceite similar como subproducto.

35 Es el objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para aislar la proteína nativa a partir de una harina de semilla oleaginosa o de una torta de aceite de semilla oleaginosa que comprende proteínas y compuestos polifenólicos. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- extraer la harina con agua para obtener una disolución acuosa;
- concentrar el extracto acuoso para formar una disolución acuosa que comprende 5 a 30% en peso de proteínas, preferiblemente 10 a 30% en peso de proteínas;
- 40 - añadir un disolvente soluble en agua a la disolución acuosa concentrada para obtener un precipitado de proteínas, en donde el disolvente soluble en agua es etanol, etanol que se añade hasta un contenido final entre 60 y 80% en vol.; y
- separar el precipitado de proteínas de la fracción líquida.

Ventajosamente, el procedimiento puede comprender, además, una o una combinación de las etapas adicionales o subsiguientes de

- 45 - lavar el precipitado de proteínas; y
- secar el precipitado de proteínas.

50 En una realización preferida de la invención, después de la etapa de extracción y antes de la adición del disolvente soluble en agua, la disolución acuosa o disolución acuosa concentrada se somete a diafiltración, preferiblemente mediante el uso de UF (ultrafiltración). Durante esta etapa de diafiltración hidratos de carbono solubles, glucosinolatos o sus derivados, fitatos o compuestos polifenólicos o una combinación de uno o más de estos compuestos puede ser separados de la disolución acuosa o disolución acuosa concentrada. Esta diafiltración tiene lugar antes, durante o después de concentrar el extracto acuoso. La diafiltración puede hacerse independientemente de la etapa de concentración o se puede combinar con la etapa de concentración, por ejemplo mediante el uso de UF.

El disolvente soluble en agua es etanol. Preferiblemente, la fracción líquida después de la separación comprende compuestos polifenólicos.

5 La presente invención describe un procedimiento para la producción de proteínas de semillas oleaginosas nativas aisladas o una composición de proteínas de semillas oleaginosas nativas de una manera que sea económicamente atractivo y al mismo tiempo sea sostenible debido al uso de compuestos reciclables tales como agua y el disolvente soluble en agua etanol que puede dar lugar a la producción de productos proteicos de calidad alimentaria.

10 El precipitado proteico o aislado proteico secado tiene un contenido en proteínas de al menos 80% en peso. El contenido en proteínas se determina sobre la base de materia seca por el método Kjeldahl. Un aislado proteico es una fracción de proteínas aislada de harina de semillas oleaginosas, en donde el aislado tiene un contenido en proteínas mayor que o igual a 80% en peso, preferiblemente al menos 90% en peso, basado en materia seca. Típicamente, el aislado proteico tiene un contenido de proteínas de 92 a 99% en peso basado en materia seca. Típicamente, el contenido no proteico del aislado proteico incluye compuestos no proteicos, tales como sustancias anti-nutricionales, grasas, fibras y otros componentes. Ejemplos de harina de semillas oleaginosas incluyen torta de 15 semillas, harina desgrasada o harina enriquecida en proteínas. La harina es una harina de una semilla oleaginosa tal como semilla de colza, soja, semilla de girasol, coco, lino tradicional, semilla de linola o mostaza, preferentemente la harina es harina de semilla de colza. Aunque el procedimiento de la invención se describe en esta memoria con más detalle, particularmente para harina de semilla de colza, la presente invención se puede aplicar asimismo a otras harinas de semillas oleaginosas. La harina puede ser cualquier harina resultante de la separación de aceite de semillas con niveles de proteína nativa (no desnaturalizada) variables, dando como resultado, por ejemplo, de 20 métodos de extrusión de aceite en caliente o en frío. Por proteína nativa o no desnaturalizada se entiende la proteína que ha conservado en gran medida sus propiedades funcionales que son relevantes para aplicaciones en la industria alimentaria, tales como:

- solubilidad en disoluciones acuosas,
- capacidad de unión a agua,
- 25 - capacidad de unión a grasas y/o
- capacidad de formación de espuma.

30 La harina es el subproducto después del prensado o extracción del aceite de la semilla oleaginosa o torta de aceite. El producto del procedimiento de la invención se puede utilizar para el consumo humano. Es ventajoso que las condiciones en los procedimientos utilizados para aislar el aceite de la semilla oleaginosa no resulten en la desnaturalización sustancial de la proteína presente en la semilla oleaginosa o harina. Preferiblemente las condiciones se eligen de modo que resulten en la preservación de la natividad y funcionalidad de las proteínas en la harina. Un ejemplo de condiciones suaves es el prensado en frío de semillas oleaginosas tal como semillas de colza. Las condiciones suaves durante el aislamiento de aceite, así como las condiciones del presente procedimiento 35 resultarán en un producto proteico que tiene una funcionalidad alta y, por lo tanto, tiene un alto valor para el consumo humano. Se encontró que el aislado proteico producido por el procedimiento de la presente invención es la proteína nativa (no desnaturalizada). Ventajosamente, el procedimiento de la invención resulta en proteína, en donde es sustancial el contenido en proteínas nativas de la proteína producida. El contenido en proteínas nativas es la fracción de proteína nativa presente en una proteína (en % en peso).

40 Condiciones adecuadas para la extracción acuosa de proteínas de la harina son una temperatura de entre 8 y 80 °C y preferiblemente entre 10 y 55 °C. En general, el pH está entre 5 y 10, preferiblemente entre 6 y 8.

45 La extracción de la proteína de la harina de semilla oleaginosa se lleva a cabo de cualquier manera conveniente consistente con efectuar una extracción continua de proteínas de la harina de semilla oleaginosa, tal como haciendo pasar la mezcla de harina de semilla oleaginosa y una disolución acuosa de calidad alimentaria a través de un conducto que tiene una longitud y a un caudal durante un tiempo de permanencia suficiente para efectuar la extracción deseada.

50 Alternativamente, la extracción se puede efectuar en un tanque agitado en el que la mezcla de harina de semillas oleaginosas y una disolución acuosa se alimenta de forma continua o discontinua y de la que se retira de forma continua o discontinua la disolución de proteínas acuosa. Además, el proceso puede efectuarse de una manera semi-continua equivalente a continua, en donde una mezcla de disolución acuosa de harina de semilla oleaginosa se alimenta a un primer recipiente agitado en el que la extracción se efectúa para formar la disolución acuosa de proteínas al tiempo que la disolución acuosa de proteínas se alimenta de forma continua desde un segundo recipiente agitado a la etapa de separación de la harina residual descrita más adelante. Cuando la disolución acuosa de proteínas se ha formado en el primer recipiente y el segundo recipiente se ha agotado de disolución acuosa de proteínas, el primer recipiente se convierte entonces en el primer recipiente y viceversa.

55 La fase o disolución acuosa que resulta de la etapa de extracción se puede separar de la harina residual de cualquier manera conveniente tal como empleando filtración y/o centrifugación para separar la harina residual. La harina residual separada se puede secar.

La fase acuosa o disolución acuosa se puede utilizar como tal en la etapa siguiente (adición del disolvente hidrosoluble etanol) o, preferiblemente, se puede concentrar antes de la siguiente etapa de adición del disolvente hidrosoluble etanol. La etapa de concentración puede efectuarse de cualquier manera conveniente consistente con una operación (semi) continua o por lotes (discontinua) tal como empleando cualquier técnica de membrana selectiva conveniente tal como ultrafiltración (UF), para permitir el grado deseado de concentración de la disolución acuosa de proteínas. Ventajosamente, antes, después o durante la etapa de concentración, se puede realizar la diafiltración. Esta diafiltración tiene lugar después de la etapa de extracción y antes de la adición del disolvente soluble en agua. La UF se puede utilizar para la diafiltración. Así, la UF se puede utilizar para la diafiltración, así como la concentración, o la UF se puede utilizar para la diafiltración y la etapa de concentración se hace por separado. Mediante el uso de UF para la diafiltración, la mayoría de los hidratos de carbono solubles y ANFs (factores anti-nutricionales tales como glucosinolatos y sus derivados, los fitatos y la mayoría de los compuestos polifenólicos) presentes en el extracto acuoso se puede separar ventajosamente.

La etapa de concentración puede efectuarse a cualquier temperatura conveniente, generalmente 20 a 80 °C, y durante el período de tiempo para efectuar el grado deseado de concentración. La temperatura y otras condiciones utilizadas dependen, en cierta medida, por ejemplo, del equipo de membrana utilizado para efectuar la concentración y de la concentración de proteínas deseada de la disolución.

En la etapa en la que se añade el disolvente hidrosoluble etanol, se utiliza preferiblemente un disolvente hidrosoluble de al menos 90% en volumen de disolvente, preferiblemente al menos 92% en vol. de disolvente. Así, en la etapa en la que se añade etanol, preferiblemente se utiliza al menos 90% en vol. de etanol, preferiblemente al menos 92% en vol. Se necesita la adición de disolvente hidrosoluble etanol para obtener una concentración del disolvente hidrosoluble etanol que sea lo suficientemente alta para precipitar la proteína presente. Una concentración de aproximadamente 70% en vol. de etanol es suficiente para precipitar la proteína.

La separación del precipitado de proteína y la fracción líquida se puede hacer en cualquier separador adecuado tal como mediante el empleo de filtración y/o centrifugación. La fracción líquida contendrá principalmente compuestos anti-nutricionales (tales como fitatos, compuestos fenólicos y glucosinolatos) y azúcares en el caso de que se utilice harina de semilla de colza como harina de partida. En el caso de que se utilice una etapa de diafiltración tal como se ha descrito antes, pueden estar presentes sólo restos de estos compuestos. El precipitado comprende principalmente proteína 2S (napinas o albúminas) y proteína 12S (cruciferinas o globulinas), cuando procede de semilla de colza.

El precipitado se puede lavar, por ejemplo, con un disolvente de agua/hidrosoluble tal como una disolución de etanol que contiene menos de 70% en vol. de disolvente hidrosoluble, preferiblemente que comprende 50 a 70% en peso de disolvente hidrosoluble, más preferiblemente de 50 a 70% en vol. de etanol, incluso más preferiblemente 50 a 65% en vol. de etanol y lo más preferiblemente 50 a 60% en vol. de etanol.

El precipitado se puede secar para separar el disolvente hidrosoluble residual tal como etanol al nivel de preferiblemente menos de 0,2% en peso, preferiblemente menos de 0,1% en peso de disolvente hidrosoluble tal como etanol. En general, el aislado proteico o la composición de proteínas obtenido por el procedimiento de la presente invención tiene una pureza de más de 90% en peso (basado en materia seca). Compuestos (poli)fenólicos están presentes en una concentración de menos de 0,1% en peso, preferiblemente menos de 0,05% en peso, más preferiblemente menos de 0,02% en peso y más preferiblemente menos de 0,01% en peso (basado en materia seca). El aislado proteico o la composición de proteínas se puede secar de cualquier manera conveniente tal como mediante secado por pulverización, secado en lecho fluido, liofilización o secado en tambor al vacío, a una forma seca, para proporcionar un aislado proteico seco que tiene un contenido en proteínas de al menos 70 % en peso, preferiblemente al menos 80% en peso, más preferiblemente al menos 85% en peso e incluso más preferiblemente al menos 90% en peso. Preferiblemente, el aislado proteico seco o la composición de proteínas tiene un contenido en materia seca de al menos 70% en peso, preferiblemente al menos 80% en peso, más preferiblemente al menos 85% en peso e incluso más preferiblemente al menos 90% en peso, todavía más preferiblemente al menos 91% en peso, incluso aún más preferiblemente tiene un contenido en materia seca de 92 a 99% en peso y lo más preferiblemente de 93 a 98% en peso. En general la temperatura del aislado proteico se mantiene por debajo de 60 °C durante el secado.

De acuerdo con un objeto de la invención, el aislado proteico obtenido con el procedimiento de la presente invención es adecuado para el consumo humano. La separación de los fitatos, compuestos fenólicos (o compuestos polifenólicos) y glucosinolatos evita un sabor poco atractivo y la coloración y el valor nutricional disminuido del aislado proteico. Al mismo tiempo, esta separación mejora el contenido en proteínas del aislado proteico.

En el presente procedimiento se utilizan líquidos que tienen diferentes cantidades de disolvente soluble en agua tal como etanol. La persona experta entenderá que varios de los flujos de tipo disolvente hidrosoluble en el procedimiento se pueden re-circular, se pueden volver a utilizar en otras partes del procedimiento o se pueden volver a utilizar después de su procesamiento, por ejemplo, después de destilar para aumentar el contenido en disolvente. La persona experta apreciará que se puede diseñar un uso óptimo de disolvente hidrosoluble tal como etanol y en el procedimiento se "consumirá" el menor disolvente hidrosoluble posible tal como etanol, con el fin de obtener un procedimiento sostenible.

Métodos y Materiales*Contenido en proteínas*

5 El contenido en proteínas se determinó por el método de Kjeldahl de acuerdo con el Método Oficial 991.20 Nitrógeno (Total) en leche de AOAC. Se utilizó un factor de conversión de 6,25 para determinar la cantidad de proteína (% (p/p)).

Contenido en humedad

El contenido en humedad se determinó de acuerdo con el: Food Chemical Codex, edición 7, Pruebas y ensayos generales, Apéndice II, páginas 1133-1134.

Contenido total en cenizas

10 El contenido total en cenizas se determinó de acuerdo con el Food Chemical Codex, edición 7, Pruebas y ensayos generales, Apéndice II, C, página 1746.

Contenido en fitatos

15 El contenido en fitatos se basó en el ensayo de fitasa descrito en el Food Chemical Codex (FCC7, Pruebas y ensayos generales, apéndice V, páginas 1207-1208. Los reactivos y las disoluciones utilizados son similares, con la excepción de la disolución tampón acetato, que adicionalmente contiene Tween 20 al 1% (v/v). En lugar de la disolución de sustrato, se utilizó una disolución de fitatos de referencia que contenía fitato 10 mM en tampón acetato. Se utilizó una disolución que contenía 1,25 unidades de fitasa/ml en tampón acetato para la conversión de fitatos. Se ha creado una línea de calibración de fitatos en el intervalo de fitato 0,1 a 0,5 mM. Para todas las muestras y patrones, la incubación se realizó a 37°C durante 120 minutos. El contenido en fitato en las muestras se ha derivado directamente de la relación para el patrón de fitato entre la concentración de fitato y la absorción después de la reacción a 415 nm.

Solubilidad en nitrógeno (NS%)

Se prepararon disoluciones de proteínas disolviendo polvo de proteína a una concentración de proteína de 2% (p/p) en agua desmineralizada. El pH se ajustó a 8,0 con HCl 4M o NaOH 4M. (No se añadió sal adicional).

25 Las disoluciones se incubaron durante 2 horas a 50°C al tiempo que se agitaba vigorosamente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 20.000 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. El contenido en proteínas del sobrenadante y las muestras de polvo de la proteína se analizaron por el método de Kjeldahl. La solubilidad en nitrógeno (NS%) se define como:

$$NS\% = \frac{\text{nitrógeno en el sobrenadante (mg)}}{\text{nitrógeno total en una muestra de 100 mg}} \times 100\%$$

30 *Contenido en polifenoles o compuestos fenólicos*

La concentración de polifenoles o compuestos fenólicos se determinó utilizando un método UPLC-UV para la cuantificación de ácido sinápico y sus análogos. El método se basa en el análisis de compuestos fenólicos de patata descritos por Narváez-Cuenca et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (10247-10255) con adaptaciones menores tal como se describe más adelante.

35 Un sistema Acquity UPLC (Waters) estaba equipado con una columna Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm, 2,1 x 150 mm, Waters) utilizando un detector PDA a 320 nm para la detección. La fase móvil A consistía en ácido fórmico al 0,1% en agua y la fase móvil B consistía en ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo aplicando un caudal de 0,4 mL/min en el modo de gradiente. La temperatura de la columna se fijó en 30° C y el volumen de inyección fue de 2 µL.

40 Ácido sinápico se utilizó como patrón de referencia (curva de calibración 0,1 -100 mg/L) disuelto en 50% en vol. de metanol que contenía ácido acético al 0,5% en peso. Se disolvió aproximadamente 1,0 g de muestra en 10 mL de metanol al 70% en vol. y se mezcló subsiguientemente durante 1 h. Una parte alícuota se transfirió a un tubo Eppendorf, se centrifugó durante 10 min a 14.000 rpm y el sobrenadante se diluyó 1:1 con 50% en vol. de metanol que contiene ácido acético al 0,5% en peso. La concentración de polifenoles se calculó determinando el área pico total de ácido sinápico y sus análogos por interpolación con la curva de calibración de ácido sinápico. La concentración total de polifenoles se expresó como % en peso.

Contenido en hidratos de carbono:

La concentración total de hidratos de carbono se determinó mediante el análisis de ácido fenol-sulfúrico, que ha sido descrito por Rao et al. Anal. Biochem. 181 (1989), págs. 18-22. El método incluye la degradación de la fracción de polisacárido a través de la hidrólisis ácida con ácido sulfúrico (aproximadamente 70%) en monosacáridos (p. ej., glucosa, manosa) a temperatura elevada. En este entorno de carácter ácido, los monosacáridos son posteriormente deshidratados y se convierten en 2-furaldehídos, también llamados furfuroles. En el entorno de carácter ácido, el fenol se protoniza, dejando una molécula reactiva que reaccionará con las moléculas de furfural. El producto de condensación está altamente conjugado y es cromogénico. La intensidad del color naranja se puede medir espectrofotométricamente a 490 nm. El color de este compuesto corresponde a la cantidad de mono-sacárido presente. El contenido real se ha derivado de una curva de calibración producida utilizando glucosa como patrón.

10 *Contenido en grasa*

El contenido en grasa se determinó de acuerdo con el método de AOCS 6ª edición, Ce 1-62.

Contenido en glucosinolatos

El contenido en glucosinolatos se determinó de acuerdo con el REGLAMENTO DE LA COMISIÓN (CEE) nº 1864/90 de 29 de junio de 1990 que modifica el Reglamento (CEE) nº 1470/68.

15 *Contenido en etanol (del producto o la composición de la invención)*

El contenido en etanol se determinó con el uso de un análisis de espacio de cabeza por CG. 25 mg de la muestra y 1,5 g de cloruro de sodio se colocaron en un vial de vidrio con tapa. La muestra se suspendió en 1 ml de agua y el vial se cerró. A una temperatura de 60 °C, después de haber alcanzado el equilibrio en el espacio de cabeza, se inyectó 1 ml del espacio de cabeza en un cromatógrafo de gases por medio de una inyección con división 1:20.

20 El cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna DB 624 (60 m x 0,25 mm d.i, película 1,2 µm) y un detector de ionización de llama. El gas nitrógeno se utilizó como gas portador con un caudal de 3 ml/min. La temperatura de la columna se ajustó inicialmente a 50 °C, seguido de un gradiente lineal de temperatura de 30 °C/min a 200 °C, en cuyo valor se mantuvo durante 6 min. El etanol se mide con el detector de ionización de llama y el Chromeleon se empleó para el procesamiento de datos. La retención de etanol en este sistema se determinó mediante inyección de un etanol estándar. La cantidad de etanol en la muestra se determinó mediante el uso de una adición estándar de etanol a la muestra en un intervalo adecuado.

Determinación del contenido en proteínas de fracción S, por ejemplo el contenido en proteínas 2S y 12S en proteína de semilla de colza

30 El contenido de las fracciones S se determinó utilizando cromatografía de exclusión por tamaño, con las proteínas de la semilla de colza comercialmente purificadas como referencia. Las muestras de proteínas se han disuelto en el eluyente, disolución de NaCl 0,1 M. La separación se realizó en una columna Waters BEH200 (1,7 µm, 4,6 X 150 mm), a 40 °C y 0,5 ml/min. La detección de los picos de proteínas se realizó utilizando absorción UV a 280 nm y el índice de refracción. La cuantificación del contenido de las fracciones S se llevó a cabo basándose en el área de los picos principales en los cromatogramas de las proteínas de referencia.

35 **Ejemplo 1**

1 kg de torta de semilla de colza dos veces prensada se suspendió con 5 litros de agua. Durante la mezcladura, el pH se ajustó a 7 utilizando una disolución de hidróxido de sodio. La extracción se hizo a una temperatura controlada de 30 °C durante 1 hora con agitación. La separación sólido-líquido se realizó durante 30 minutos a aproximadamente 4000 g a temperatura ambiente (22 °C). El sobrenadante se recogió por decantación y tamizado (tamiz de 0,15 - 0,25 mm) para separar la capa superior grasa.

40 La concentración del extracto acuoso se realizó utilizando un módulo de ultrafiltración (UF) de 10 kD y una bomba. El concentrado se concentró aproximadamente diez veces a la vista del sobrenadante antes de concentrarse. El concentrado se lavó 3 veces con agua (relación en volumen de concentrado : agua = 1 : 3) y el concentrado lavado se recoge de la unidad de UF. La membrana se lavó con algo de agua para aumentar la producción de proteína y el factor de concentración final fue de aproximadamente cuatro veces.

50 Se realizó una precipitación con etanol inducida mediante la adición de etanol concentrado de calidad alimentaria (al 95%) al concentrado lavado hasta una concentración final de etanol al 70% en vol. (relación en volumen de concentrado : etanol = 1 : 2,3). Durante la adición de etanol, la mezcla se combinó a fondo. El precipitado se separó después de la centrifugación (15 min 4000 g a temperatura ambiente) y se resuspendió en etanol al 70% en vol. (relación en peso de 1: 5). Después de la centrifugación (15 min 4000 g a temperatura ambiente) se secó el sedimento en una incubadora de vacío (120 mbar, 45 °C) para dar lugar a 210 g de proteína de semilla de colza que tiene un contenido en materia seca de 93,6% de materia seca.

Ejemplo 2. A escala de laboratorio, extracción a 30°C

Se realizó un experimento a escala de laboratorio incluyendo la precipitación etanólica (Precipitación Inducida por Etanol = PIE) con la torta de semilla de colza a 30°C.

5 1500 g de torta de semilla de colza se suspendieron en 7500 g de agua de proceso. El pH se ajustó a 7 mediante la adición de 70 g de NaOH 4 N. La extracción se realizó durante 90 minutos a 30°C bajo agitación mediada utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l. La temperatura de partida de la suspensión de semilla de colza se dirigió a 30°C mediante el uso de agua precalentada antes de la adición de la torta de semilla de colza.

La separación de grasa, sólidos y la fase líquida se realizó utilizando una centrífuga oscilante (4000 g, 30 minutos, 10°C). La capa superior grasa se separó de la fase acuosa vertiendo el extracto sobre un tamiz (0,25 mm).

10 La fracción acuosa se concentró y se lavó a temperatura ambiente utilizando una bomba y una membrana de 10 kD. La presión de transmembra aplicada fue de 1 bar. El lavado se realizó después de concentrar la fracción acuosa de 6342 g a 400 g con 3 x 3 volúmenes de agua desionizada. El concentrado de lavado final (1018 g) tenía un contenido de materia seca de 23%.

15 970 g de concentrado se suspendieron con 2266 ml de etanol al 96% en vol. de 10°C. Después de mezclar a fondo utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas, la mezcla se centrifugó en una centrífuga oscilante (4000 g, 10 minutos, 10°C). El sedimento se resuspendió en 1440 ml de etanol al 70% en vol. de 10°C y, después de mezclar a fondo, se centrifugó de nuevo. Se secó el sedimento después de desmenuzarlo con una cuchara. El material secado se homogeneizó adicionalmente y se redujo en tamaño utilizando un mezclador IKA M20.

20 Tabla 2. Composición de las fracciones en el procesamiento a escala de laboratorio de semilla de colza a 30°C

Muestra	Materia seca (%)	Proteína (% basado en MS)	Grasa (% basado en MS)	Compuestos fenólicos (% basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)
Torta de semilla de colza	90	38	19	1,5	100
Extracto acuoso	7,7	53	5,6	2,2	53
Concentrado lavado antes de la PIE	22	87	9,5	0,24	2,7
Concentrado lavado después de la PIE y secado	93	86	6,4	0,01	0,02

Ejemplo 3. A escala de laboratorio, extracción a 15°C

Se realizó un experimento a escala de laboratorio incluyendo precipitación etanólica con torta de semilla de colza extraída a 15°C.

25 800 g de torta de semilla de colza se suspendieron en 4000 g de agua de proceso. El pH se ajustó a 7 mediante la adición de 35 g de NaOH 4 N. La extracción se realizó durante 30 minutos a 15°C bajo agitación mediada utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l con una camisa conectada a un baño de agua. La temperatura de partida de la suspensión de semilla de colza se dirigió a 15°C mediante el uso de agua fría antes de la adición de la torta de semilla de colza.

30 La separación de grasa, sólidos y la fase líquida se realizó utilizando una centrífuga oscilante (4000 g, 30 minutos, 10°C). La capa superior grasa se separó de la fase acuosa vertiendo el extracto sobre un tamiz (0,25 mm).

La fracción acuosa se concentró y se lavó a 15°C utilizando una bomba y una membrana de 10 kD. La presión de transmembra aplicada fue de 1 bar. El lavado se realizó después de concentrar la fracción acuosa de 3193 g a 519 g (contenido en materia seca de 19%) con 3 x 3 volúmenes de agua desionizada.

35 496 g de concentrado se suspendieron con 1165 ml de etanol al 96% en vol. de 10°C. Después de mezclar a fondo utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas, la mezcla se centrifugó en una centrífuga oscilante (4000 g, 10 minutos, 10°C). El sedimento se resuspendió en 1000 ml de etanol al 70% en vol. de 10°C y, después de mezclar a fondo, se centrifugó de nuevo. Se secó el sedimento después de desmenuzarlo con

una cuchara. El material secado se homogeneizó adicionalmente y se redujo en tamaño utilizando un mezclador IKA M20.

Tabla 3. Composición de las fracciones en el procesamiento a escala de laboratorio de semilla de colza a 15°C

Muestra	Materia seca (%)	Proteína (% basado en MS)	Grasa (% basado en MS)	Compuestos fenólicos (% basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)
Torta de semilla de colza	92	38	17	1,8	100
Extracto acuoso	6,4	50	5,2	2,8	43
Concentrado lavado antes de la PIE	19	79	7,3	0,91	6,6
Concentrado lavado después de la PIE y secado	90	87	6,3	0,06	0,04

La solubilidad de nitrógeno del concentrado lavado después de la PIE y el secado fue de 74%.

5 Ejemplo 4. A escala de laboratorio, extracción a 50°C

Un experimento de laboratorio a mayor escala incluyendo precipitación etanólica con torta de semilla de colza extraída a 50°C se realizó en tres experimentos.

10 En 3 experimentos separados, en total 4800 g de torta de semilla de colza se suspendieron en 24000 g de agua de proceso. El pH se ajustó a 7 mediante la adición de 212 g de NaOH 4 N. La extracción se realizó durante 30 minutos a 50°C bajo agitación mediada utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l. La temperatura de partida de la suspensión de semilla de colza se dirigió a 50°C mediante el uso de agua a 60°C antes de la adición de la torta de semilla de colza.

15 Después de la incubación, la temperatura de la suspensión de semilla de colza se redujo a 15°C mediante el intercambio de agua en el baño de agua por agua enfriada con hielo. El periodo de enfriamiento fue de aproximadamente 30 minutos.

La separación de grasa, sólidos y la fase líquida se realizó utilizando una centrífuga oscilante (4000 g, 30 minutos, 10°C). La capa superior grasa se separó de la fase acuosa vertiendo el extracto sobre un tamiz (0,25 mm).

20 La fracción acuosa (3 tandas) se concentró y se lavó a 50°C utilizando una bomba y una membrana de 10 kD. La presión de transmembrana aplicada fue de 2,5 bares. El lavado se realizó después de concentrar la fracción acuosa de 6000 g a 600 g con 3 x 3 volúmenes de agua desionizada.

25 1000 g de concentrado lavado se suspendieron con 2300 ml de etanol al 96% en vol. de 10°C. Después de mezclar a fondo utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas, la mezcla se centrifugó en una centrífuga oscilante (4000 g, 10 minutos, 10°C). El sedimento se resuspendió en 2000 ml de etanol al 70% en vol. de 10°C y, después de mezclar a fondo, se centrifugó de nuevo. Se secó el sedimento después de desmenuzarlo con una cuchara. El material secado se homogeneizó adicionalmente y se redujo en tamaño utilizando un mezclador IKA M20.

Tabla 4. Composición de las fracciones en el procesamiento a escala de laboratorio de semilla de colza a 50°C

Muestra	Materia seca (%)	Proteína basado MS (%)	Grasa basado MS (%)	Compuestos fenólicos (% basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)
Torta de semilla de colza	92	38	19	1.8	100
Extracto acuoso					
Experimento 1	7,2	52	6,1	2,6	43
Experimento 2	7,3	50	6,5	2,5	42
Experimento 3	7,4	51	7,1	2,3	39
Concentrado lavado					
Experimento 1	20	86	10	nd	nd
Experimento 2	19	85	11	0,16	1,2
Experimento 3	25	88	9,8	0,12	0,9
Concentrado lavado después de la PIE y secado					
Experimento 1	93	87	9,7	< 0,01	<0,1
Experimento 2	96	89	9,5	< 0,01	<0,1
Experimento 3	95	88	8,5	0,01	0,1

La solubilidad de nitrógeno del concentrado lavado después de la PIE y secado (mezcla de los experimentos 1, 2 y 3) fue de 74%.

5 Ejemplo 5. A escala piloto, extracción a 50°C

Torta de semilla de colza se extrajo a 50°C a escala piloto. El procesamiento adicional del concentrado lavado se realizó a escala de laboratorio.

60 kg de torta de semilla de colza se suspendió en 300 kg de agua. El pH se ajustó a 6 mediante la adición de 2,625 kg de NaOH 1 N. La extracción se realizó a 50°C con agitación utilizando un dispositivo de agitación superior y un pequeño agitador de paletas plegadas en un recipiente de 500 l. El agua se llevó a ebullición y se enfrió a 60°C antes de la adición de la torta de semilla de colza. La incubación duró 2 horas debido a la capacidad límite del decantador utilizado (300 kg/h).

Después del decantador, la temperatura del extracto se disminuyó a 15°C a través de un intercambiador de calor. La separación de las fases grasa y líquida se realizó utilizando una centrífuga de discos continua. El volumen de la corriente lateral grasa fue de 10% del volumen total.

La fracción acuosa se concentró y se lavó a 50°C utilizando un dispositivo de ultrafiltración con una membrana de material cerámico de 10 kD. La presión de la transmembrana aplicada fue de 2,5 bares. El lavado después de la concentración se realizó de forma continua con 4 volúmenes de agua desionizada.

A 10 kg de concentrado lavado (contenido en materia seca de 16%) se añadieron lentamente con agitación 23 l de etanol (al 96% en vol., 10°C). La mezcla de etanol al 70% en vol. se centrifugó en una centrífuga oscilante (4000 g,

10 minutos, 10°C). El sedimento se resuspendió en 4 l de etanol al 70% en vol. de 10°C y, después de mezclar a fondo, se centrifugó de nuevo. Se secó el sedimento después de desmenuzarlo con una cuchara. El material secado (1230 g de materia seca al 97%) se homogeneizó adicionalmente y se redujo de tamaño utilizando un molino Alpine (malla de hoja de 1 mm).

5

Tabla 5. Composición de las fracciones en el procesamiento a escala piloto de semilla de colza a 50°C

Muestra	Materia seca (%)	Proteína (% basado en MS)	Grasa (% basado en MS)	Compuestos fenólicos (% basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)	Fitato (% basado en MS)
Torta de semilla de colza	92	38	17	1,7	100	2,5
Extracto acuoso después de descremar	8	48	12	2,6	39	Nd
Concentrado lavado	16	74	19	0,29	1,4	Nd
Concentrado lavado después de la PIE y secado	97	72	14	0,05	0,18	0,14

La solubilidad de nitrógeno del concentrado lavado después de la PIE y el secado fue de 81%.

Ejemplo 6. Precipitación etanólica de torta de girasol

10 Para mostrar el efecto de la precipitación etanólica para otras semillas oleaginosas distintas de las semillas de colza el proceso se realizó con torta de girasol (después de prensado durante 1 vez).

1600 g de torta de girasol molida se suspendieron en 8000 g de agua de proceso. El pH endógeno fue de 7, de modo que no se aplicó ajuste alguno. Se añadió sulfito (1 g/l) para controlar la microbiología y evitar la oxidación de compuestos fenólicos. La extracción se realizó durante 30 minutos a 15°C bajo agitación mediada utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l.

15 La separación de grasa, sólidos y la fase líquida se realizó utilizando una centrífuga oscilante (4000 g, 30 minutos, 10°C). La capa superior grasa se separó de la fase acuosa vertiendo el extracto sobre un tamiz (0,25 mm).

La fracción acuosa se concentró y se lavó a 15°C utilizando un dispositivo de ultrafiltración y una membrana de 10 kD. La presión de transmembrana aplicada fue de 2,5 bares. El lavado se realizó después de concentrar la fracción acuosa con 3 x 3 volúmenes de agua desionizada.

20 A 200 g de concentrado lavado (contenido de materia seca 10,0%) se añadieron 460 ml de etanol (al 96% en vol., 10°C) lentamente con agitación. La mezcla a etanol al 70% en vol. se centrifugó en una centrífuga oscilante (4000 g, 10 minutos, 10°C). El sedimento se resuspendió en 200 ml de etanol al 70% en vol. de 10°C y, después de mezclar a fondo, se centrifugó de nuevo. Se secó el sedimento después de desmenuzarlo con una cuchara.

Tabla 6. Composición de las fracciones en el procesamiento a escala de laboratorio a 15°C de torta de girasol

Muestra	Materia seca (%)	Proteína (% basado en MS)	Grasa (% basado en MS)	Compuestos fenólicos (% basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)
Torta de girasol	93,2	30	32	1,1	100
Extracto acuoso	3,5	41	5,6	3,3	42
Concentrado lavado	10,0	85	7,5	0,26	1,3
Concentrado lavado después de la PIE y	71,5	89	5,7	0,01	0,04

Muestra	Materia seca (%)	Proteína (%) basado en MS)	Grasa (%) basado en MS)	Compuestos fenólicos (%) basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)
secado					

Ejemplo 7. Precipitación etanólica de harina de soja

Se realizó una combinación de precipitación con etanol frío y con harina de soja activa con enzima de grasa completa.

5 1600 g de torta de girasol molida se suspendió en 8000 g de agua de proceso. El pH endógeno fue de 6,8, por lo que no se aplicó ajuste alguno. Se añadió sulfito (1 g/l) para controlar la microbiología y evitar la oxidación de compuestos fenólicos. La extracción se realizó durante 30 minutos a 15°C bajo agitación mediada utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l.

La separación de grasa, sólidos y la fase líquida se realizó utilizando una centrifuga oscilante (4000 g, 30 minutos, 10°C). La capa superior grasa se separó de la fase acuosa vertiendo el extracto sobre un tamiz (0,25 mm).

10 La fracción acuosa se concentró y se lavó a 15°C utilizando una bomba y una membrana de 10 kD en un recipiente establecido térmicamente. La presión de transmembra aplicada fue de 2,5 bares. El lavado se realizó después de concentrar la fracción acuosa de con 3 x 3 volúmenes de agua desionizada pre-calentada.

15 Al sobrenadante (765 g) se añadieron lentamente con agitación 1780 ml (1419 g) de etanol (al 96% en volumen) de 10°C. La mezcla de etanol al 70% en vol. se centrifugó en una centrifuga oscilante (4000 g, 10 minutos, <10°C). El sedimento se resuspendió en 1500 ml de etanol al 70% en vol. de 10°C y, después de mezclar a fondo, se centrifugó de nuevo. Se secó el sedimento después de desmenuzarlo con una cuchara. El material secado (189 g de materia seca al 83%) se homogeneizó adicionalmente utilizando un mezclador IKA M20.

Tabla 7. Composición de las fracciones en el procesamiento a escala de laboratorio a 15°C de la harina de soja activa con enzima de grasa completa

Muestra	Materia seca (%)	Proteína (%) basado en MS)	Grasa (%) basado en MS)	Compuestos fenólicos (%) basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)
Harina de soja	94	42	24	0,08	100
Extracto acuoso	10	53	14	0,11	71
Concentrado lavado antes de la PIE	26	65	16	0,05	20
Concentrado lavado después de la PIE y secado	83	74	14	< 0,01	0,3

20 **Ejemplo 8. Tratamiento previo de la torta de semilla de colza con isohexano o etanol**

25 Para mostrar el efecto del tratamiento previo de la torta de semilla de colza después del prensado en la separación de compuestos fenólicos, se ha realizado un experimento comparando la extracción acuosa de la torta de semilla de colza con isohexano o etanol al 70% en vol. y sin tratamiento previo. Los resultados demuestran el efecto específico de etanol sobre la separación de compuestos fenólicos en comparación con agua y un disolvente no miscible con agua.

Tratamiento previo con isohexano:

1000 g de torta de semilla de colza se extrajeron con 5 l de isohexano. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, la separación sólido - líquido se realizó mediante filtración. El peso del sedimento después del secado fue 831,5 g, la materia seca fue de 92,5%.

30 La torta de semilla de colza tratada previamente con isohexano se suspendió en 4332 g de agua de proceso. El pH se ajustó a pH 7 mediante la adición de 62,72 g de NaOH 4 N. La extracción se realizó a 30°C con agitación usando un dispositivo de agitación superior y un pequeño agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l.

Tratamiento previo con etanol:

1000 g de torta de semilla de colza se extrajeron con 5 l de etanol al 70% en vol. Después de 1 hora de incubación a 30°C, la separación sólido - líquido se realizó mediante centrifugación (4000 g, 30 minutos, 20°C). El peso del sedimento después del secado fue 844,2 g, la materia seca fue de 86,0%.

- 5 La torta de semilla de colza tratada previamente con etanol se suspendió en 4309 g de agua de proceso. El pH se ajustó a pH 7 mediante la adición de 30,73 g de NaOH 4 N. La extracción se realizó a 30°C con agitación usando un dispositivo de agitación superior y un pequeño agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l.

Torta de semilla de colza no tratada previamente:

- 10 1000 g de torta de semilla de colza se suspendieron en 5000 g de agua de proceso. El pH se ajustó a 7 mediante la adición de 40,66 g de NaOH 4N. La extracción se realizó durante 60 minutos a 30°C bajo agitación mediada utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l.

Para todas las 3 suspensiones, la separación de grasa, sólidos y fase líquida se realizó utilizando una centrífuga oscilante (4000 g, 30 minutos, 10°C). La capa superior grasa se separó de la fase acuosa vertiendo el extracto sobre un tamiz (0,25 mm).

- 15 La fracción acuosa se concentró y se lavó a temperatura ambiente utilizando una bomba y una membrana de 10 kD en un recipiente de 2 l. La presión de transmembra aplicada fue de 1 bar. El lavado se realizó después de concentrar la fracción acuosa de 4000 g a 600 g con 3x 3 volúmenes de agua desionizada.

Tabla 8. Composición de las fracciones en el procesamiento a escala de laboratorio de la torta de semilla de colza tratada previamente a 30°C

Muestra	Materia seca (%)	Proteína basado en MS)	(% en Grasa basado en MS)	(% en Compuestos fenólicos (% basado en MS)	Rendimiento de compuestos fenólicos (%)
Torta de semilla de colza no tratada	91	37	19	1,5	100
Extracto acuoso	7,7	54	5,5	2,0	46
Concentrado lavado	20	85	9,8	0,18	3,8
Torta de semilla de colza extraída con isohexano	93	45	4,9	1,8	96
Extracto acuoso	8,2	54	2,5	2,0	42,3
Concentrado lavado	18	92	4,7	0,20	1,8
Torta de semilla de colza extraída con etanol	86	40	20	0,22	21
Extracto acuoso	4,6	69	2,5	0,55	6,0
Concentrado lavado	13	93	3,8	0,02	0,1

20

Ejemplo 9. A escala de laboratorio, extracción a 30°C

1500 g de torta de semilla de colza se suspendieron en 7500 g de agua de proceso. El pH se ajustó a 7 mediante la adición de 59 g de NaOH 4 N. La extracción se realizó durante 60 minutos a 30°C bajo agitación mediada utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas en un recipiente de 10 l. La temperatura de partida de la suspensión de colza se dirigió a 30°C mediante el uso de agua precalentada antes de la adición de la torta de semilla de colza.

25

La separación de grasa, sólidos y fase líquida se realizó utilizando una centrífuga oscilante (4000 g, 30 minutos, 10°C). La capa superior grasa se separó de la fase acuosa vertiendo el extracto sobre un tamiz (0,25 mm).

ES 2 565 655 T3

La fracción acuosa se concentró y se lavó a temperatura ambiente utilizando una bomba y una membrana de 10 kD. La presión de transmembra aplicada fue de 1 bar. El lavado se realizó después de concentrar la fracción acuosa de 6000 g a 650 g con 3 x 2,5 volúmenes de agua desionizada. El concentrado de lavado final (928 g) tenía un contenido en materia seca de 21%.

- 5 842 g de concentrado se suspendieron con 2062 g de etanol al 96% en vol. de 10°C. Después de mezclar a fondo utilizando un dispositivo de agitación superior y un agitador de paletas plegadas, la mezcla se centrifugó en una centrífuga oscilante (4000 g, 10 minutos, 10°C). El sedimento se resuspendió en 1000 ml de etanol al 70% en vol. de 10°C y, después de mezclar a fondo, se centrifugó de nuevo. Se secó el sedimento después de desmenuzarlo con una cuchara. El material secado se homogeneizó adicionalmente y se redujo de tamaño utilizando un mezclador IKA M20.
- 10

El contenido en etanol del concentrado lavado después de la PIE y el secado fue de 0,15% en peso.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para aislar proteínas nativas de la harina de semillas oleaginosas o de la torta de aceite de semillas oleaginosas, que comprende las siguientes etapas:
 - extraer la harina con agua para obtener una disolución acuosa;
- 5 • concentrar el extracto acuoso para formar una disolución acuosa que comprende 5 a 30% en peso de proteína, preferiblemente 10 a 30% en peso de proteína;
 - añadir un disolvente hidrosoluble a la disolución acuosa concentrada para obtener un precipitado de proteínas, en donde el disolvente hidrosoluble es etanol, etanol que se añade hasta un contenido final entre 60 y 80% en vol; y
- 10 • separar el precipitado de proteínas de la fracción líquida.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende la etapa adicional de lavar el precipitado de proteínas.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende la etapa adicional de secar el precipitado de proteínas.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones, en el que después de la etapa de extracción y antes de la adición del disolvente hidrosoluble la disolución acuosa o la disolución acuosa concentrada se diafiltra, preferiblemente utilizando la UF (ultrafiltración).
5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en el que hidratos de carbono solubles, glucosinolatos o sus derivados, fitatos o compuestos polifenólicos o una combinación de uno o más de estos compuestos se separan de la disolución acuosa o de la disolución acuosa concentrada.
- 20 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5, en el que la diafiltración tiene lugar antes, durante o después de concentrar el extracto acuoso.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la harina es harina de semilla de colza, soja o girasol.
- 25 8. Una proteína de semilla oleaginosa nativa aislada o una composición de proteínas de semillas oleaginosas nativas, que comprende
 - un contenido en proteínas de al menos 80% en peso, preferiblemente al menos 85% en peso, más preferiblemente al menos 90% en peso, y lo más preferiblemente entre 92 y 99% en peso (basado en materia seca);
 - un contenido en etanol de menos de 0,2% en peso, preferiblemente menos de 0,1% en peso (basado en materia seca);
 - un contenido en etanol de más de 0,001% en peso, preferiblemente más de 0,01% en peso (basado en materia seca); y
 - un contenido fenólico de menos de 0,1% en peso, preferiblemente menos de 0,05% en peso, más preferiblemente menos de 0,02% en peso (basado en materia seca) expresado como equivalentes de ácido sináptico.
- 30 9. Una proteína aislada o una composición de proteínas de la reivindicación 8, que tiene un contenido en glucosinolatos de menos de 10 µmol/g, preferiblemente menos de 1 µmol/g (basado en materia seca).
10. Una proteína aislada o una composición de proteínas de la reivindicación 8 ó 9, que tiene un contenido en lípidos de 2 a 15% en peso, preferiblemente de 2 a 10% en peso, más preferiblemente de 2 a 8% en peso (basado en materia seca) o de 2 a 20% en peso, preferiblemente de 2 a 15% en peso (basado en materia seca) en el caso de la proteína de soja.
- 40 11. Una proteína aislada o una composición de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que tiene un contenido en fitato (P x 3,5) de menos de 0,5% en peso, preferiblemente menos de 0,2% en peso (basado en materia seca).
- 45 12. Una proteína aislada o una composición de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que tiene una solubilidad de al menos 30 NS%, preferiblemente al menos 50 NS%, más preferiblemente al menos 60 NS%, incluso más preferiblemente al menos 70 NS% y lo más preferiblemente al menos 75 NS%.
13. Una proteína aislada o una composición de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que tiene un contenido en materia seca de al menos 70% en peso, preferiblemente al menos 80% en peso, más

preferiblemente al menos 85% en peso, incluso más preferiblemente al menos 90% en peso, aún más preferiblemente al menos 91% en peso, incluso todavía más preferiblemente tiene un contenido en materia seca de 92 a 99% en peso y lo más preferiblemente de 93 a 98% en peso.

5 14. Una proteína aislada o una composición de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que comprende proteínas de semilla de colza, de girasol o de soja.

15. Una proteína aislada o una composición de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que comprende semillas de colza, y en donde la proteína 2S y la proteína 12S estarán presentes en una relación de 1:6 a 6:1, preferiblemente en una relación de 1:2 a 2:1 (peso/peso basado en materia seca).