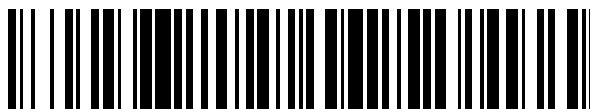


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 434**

51 Int. Cl.:

A23J 1/14 (2006.01)
A23J 3/16 (2006.01)
C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C12P 13/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C11B 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2012** **PCT/CA2012/050216**
87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012** **WO12135955**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2012** **E 12767675 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017** **EP 2584912**

54 Título: **Proceso acuoso de preparación de aislado de proteína y proteína hidrolizada procedente de una semilla oleaginosa**

30 Prioridad:

04.04.2011 US 201161471679 P
31.10.2011 US 201161553898 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2017

73 Titular/es:

SIEBTE PMI VERWALTUNGS GMBH (100.0%)
Neuer Jungfernstieg 5
20354 Hamburg, DE

72 Inventor/es:

ROZENSZAIN, LUIS y
BEYE, GARRISON

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 626 434 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

Proceso acuoso de preparación de aislado de proteína y proteína hidrolizada procedente de una semilla oleaginosa

5 **Campo de la divulgación**

La presente solicitud se refiere a un proceso acuoso de preparación de un producto proteico soluble, denominado aislado, a partir de una semilla oleaginosa y una composición que comprende aminoácidos y péptidos solubles mediante la hidrólisis de la proteína insoluble recuperada en el proceso de formación del aislado. En particular, el proceso produce el aislamiento de proteínas superiores, de alta pureza, procedentes de semilla oleaginosa, teniendo el producto un aumento significativo de proteína absorbible con respecto al disponible usando los procedimientos previos de extracción de aceite y recuperación de proteínas.

Antecedentes de la divulgación

En general, las semillas oleaginosas contienen del aproximadamente 20 % al aproximadamente 50 % en peso de aceite, variando los porcentajes con el tipo de semilla oleaginosa. A menudo, las harinas de semilla oleaginosa se prensan para eliminar la mayor parte del aceite. Sin embargo, incluso con el prensado, permanece una cantidad significativa de aceite en la harina. El contenido de aceite de la harina se puede reducir hasta aproximadamente el 10-25 % mediante procesamiento mecánico (prensado) y el procesamiento adicional usando diversos disolventes para reducir el contenido de aceite hasta aproximadamente el 3 %. En general, la harina de semilla oleaginosa prensada se elimina usando disolventes orgánicos de bajo punto de ebullición tales como el hexano. Aunque estos disolventes orgánicos pueden eliminar el aceite adicional de las harinas de semilla oleaginosa por extracción, el uso de dichos disolventes orgánicos, aunque pueden tener puntos de ebullición relativamente bajos, sigue requiriendo temperaturas elevadas para la eliminación del disolvente. Las temperaturas elevadas pueden producir la desnaturalización de la proteína, que degrada la proteína soluble, generando mayores niveles de proteína insoluble, reduciendo así el valor nutricional del producto. El uso de disolvente (distinto del agua) genera problemas medioambientales, así como problemas de recuperación y eliminación, además de un mayor uso de energía. Incluso cuando se usan temperaturas elevadas, el disolvente orgánico residual queda atrapado dentro de la harina extraída con disolvente; este disolvente residual es difícil de eliminar sin desnaturalizar la proteína de la harina.

El documento WO 2009137934 A1 describe un proceso de producción de concentrados de proteína y aislados de proteína, y un proceso de eliminación superficial de la fibra, factores antinutricionales y otros componentes de una harina de semilla oleaginosa que los contiene, para producir concentrados de proteína y aislados de proteína. En el proceso, las proteínas descritas y los concentrados de proteína se obtienen de harina desgrasada o enriquecida en proteína, es decir, de una torta prensada de semilla oleaginosa que se sometió a una extracción con disolventes hidrófobos y de bajo punto de ebullición.

El documento CA 2 244 398 A1 describe un proceso de preparación de un aislado de proteína que comprende la extracción de una harina de semilla oleaginosa que tiene un contenido de grasas de hasta aproximadamente el 10 % en peso de la harina con una solución acuosa salina de calidad alimentaria a baja temperatura (de 5 a 35 °C) para producir la solubilización de la proteína y de la grasa en dicha harina de semilla oleaginosa y formar una solución acuosa de proteína. La harina de semilla oleaginosa residual se separa de la solución acuosa de proteína, y se retira la grasa enfriando la solución y con la separación de la capa de grasa de la solución acuosa de proteína. La proteína se precipita en la solución acuosa, y la masa micelar de proteína que forma el aislado de proteína se separa del líquido sobrenadante y se seca.

El documento CA 2 751 608 A1 describe un proceso de producción de un producto de proteína de soja. La proteína de soja se extrae de la fuente de proteína de soja usando agua a bajo pH, es decir, en el intervalo de pH 1,5 a 3,6.

El documento US 2009/0036655 A1 describe una proteína de canola 2S esencialmente pura que se obtiene esencialmente exenta de proteína de canola 7S y 2S mediante la unión de la proteína de canola 2S con un medio de intercambio catiónico, permitiendo a la vez retirar por lavado otras proteínas y sustancias puras. A continuación, se retira la proteína de canola 2S del medio de intercambio catiónico mediante la exposición del medio de intercambio catiónico a solución salina a una concentración de sal adecuadamente alta.

El documento US 2010/0234569 A1 (D3) describe la solubilización del aceite residual y de la proteína en una torta prensada de canola a través de una extracción acuosa alcalina (pH > 10), la separación de la emulsión de aceite en agua de la fracción acuosa por centrifugación, la eliminación del ácido fítico de la fracción acuosa mediante el tratamiento con sales de calcio y la precipitación de un concentrado de proteína ajustando el pH de la fase acuosa a pH < 5, la recuperación de una proteína soluble, aislada de la fase acuosa por ultrafiltración/diafiltración y la liofilización o secado por pulverización.

J. Agric. Food Chem. 2005, 53, 2146-2150 describe una composición de aminoácidos, hidratos de carbono y grasa de harinas de semilla de soja obtenidas de diferentes plantas. Con este fin, se trituran las harinas de semilla de soja y se someten (para el análisis de los aminoácidos) a métodos tanto de hidrólisis como de oxidación. Se usa un

método de extracción en ácido.

El documento US 4 420 425 describe un método de producción de proteínas a partir de semilla oleaginosa no aglutinantes como semillas de soja y cacahuetes mediante solubilización y ultrafiltración. Los ejemplos y la Tabla 4 se refieren a aislados de soja. De acuerdo con la columna 4, líneas 34 a 41 del documento D6, la solubilización de la proteína puede tener lugar en un medio alcalino o en un medio ácido. El documento D6 reivindica un proceso que permite la conservación de muchos, si no todos, los productos favorables de los productos anteriores.

El documento US 3 966 971 A describe la separación de proteína de fuentes vegetales. Los materiales vegetales fuente de proteínas se dispersan en agua a un pH en el intervalo de 2 a 6, y se incluye una fitasa ácida. La fracción extraída ácida que contiene proteína soluble se separa y se seca, produciendo una proteína sólida de características deseables.

La patente de EE.UU. n.º 7.156.981 describe el uso de un disolvente de extracción que tiene un punto de ebullición incluso más bajo que el hexano. El yodotrifluorometano (CIF₃, también denominado ITFM), solo o con codisolventes tales como HFC-134, se puede usar a temperatura ambiente o inferior con presiones elevadas suficientes para mantener el disolvente en estado líquido, evitando la necesidad de temperaturas elevadas y, por tanto, reduciendo significativamente la desnaturalización de la proteína. Sin embargo, debido a la necesidad de presiones elevadas, a la cantidad de HTFM necesaria para una extracción adecuada, a los altos costes del HTFM y a los problemas medioambientales, se desea una alternativa más adecuada al hexano, HTFM u otras técnicas de extracción.

Sumario de la divulgación

En el presente documento, se desvela un proceso acuoso de preparación de productos proteicos solubles, tales como un aislado de proteína. Como se expone en el presente documento, la semilla oleaginosa no requiere el uso de disolventes para proporcionar una harina suficientemente reducida en un contenido de aceite adecuado para un procesamiento adicional. Dicha harina de semilla oleaginosa se puede procesar posteriormente sin el uso de un disolvente distinto de una solución acuosa, preferentemente solo con agua. En otras palabras, el único disolvente usado en el proceso, partiendo de la trituration de las semillas hasta la recuperación final de la proteína, es una solución acuosa, preferentemente solo agua (por ejemplo, agua corriente, agua de la ciudad o cualquier otra fuente de agua potable), y más preferentemente agua de OI (ósmosis inversa). Por consiguiente, los productos proteicos (tales como los aislados proteicos) no se contaminan de disolventes orgánicos, sales u otros medios de extracción. Diversas realizaciones producen aislados de proteínas con altas concentraciones de proteína soluble (> 90 %) que contienen menos del 2 % (p/p) de aceite.

El proceso de producción de un aislado de proteína a partir de una harina de canola o de colza de acuerdo con la invención comprende:

- proporcionar una harina de semilla oleaginosa prensada en frío, estando la harina prensada en frío a una temperatura de 85 °C o inferior;
- mezclar una harina de semilla oleaginosa con agua para formar una suspensión;
- opcionalmente, tratar la suspensión con fitasa a una temperatura y a un pH adecuados para la actividad de la fitasa;
- separar la suspensión con una separación sólido/líquido para formar:
 - una fase líquida que comprende el disolvente acuoso, proteína soluble y aceite; y
 - una fase sólida;
- separar la fase líquida para formar:
 - una fase de aceite; y
 - una fase acuosa de proteína;
- someter la fase acuosa de proteína a filtración de membrana, obteniéndose una solución de proteína; y
- secar la solución de proteína, obteniéndose el aislado de proteína.

En una realización de acuerdo con la invención, la separación sólido/líquido de la mezcla se realiza mediante una centrifuga de decantación.

En una realización de acuerdo con la invención, la centrifuga de decantación se opera a una fuerza g de entre 2.000 y 4.000 g. En una realización adicional de acuerdo con la invención, a la centrifugación de decantación le sigue una primera y una segunda centrifugas de discos en serie.

En una realización de acuerdo con la invención, la primera centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 6.000 y 9.000 g, y la segunda centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 8.000 y 12.000 g.

En una realización de acuerdo con la invención, la separación de la fase líquida se realiza mediante centrifugación. En otra realización de acuerdo con la invención, la separación de la fase líquida se realiza mediante una centrifuga de desgrasado, una centrifuga de discos, una centrifuga bifásica o una centrifuga trifásica, o una combinación de los mismos. En una realización adicional de acuerdo con la invención, la centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 2.000 y 10.000 g.

En una realización de acuerdo con la invención, el aislado de proteína comprende menos del 2 % (p/p) de aceite:

En una realización de acuerdo con la invención, el aislado de proteína obtenido mediante el proceso tiene una distribución de los aminoácidos como se presenta a continuación:

Aminoácido	g de aa/100 g de proteína
Ácido aspártico	9-10
Ácido glutámico	18-20
Serina	5-6
Glicina	5-6
Histidina	3-4
Arginina	7-8
Treonina	4-5
Alanina	4-5
Prolina	5-6
Tirosina	3-4
Valina	5-6
Metionina	2-3
Cistina	1-2
Isoleucina	3-5
Leucina	7-8
Fenilalanina	3-4
Lisina	5-6
Triptófano	1-2

En una realización de acuerdo con la invención, el aislado de proteína obtenido mediante el proceso tiene una distribución del peso molecular como se presenta a continuación:

Masa molecular (kDa)	Intervalo (basado en la microfiltración)
300	25-30
300-50	5-10
50-30	2-7
30-10	15-25
10-5	15-25
<5	15-25

En una realización de acuerdo con la invención, el aislado de proteína obtenido mediante el proceso comprende:

- (i) una primera parte de proteínas que tienen un peso molecular superior a 300 kDa, en el que la primera parte representa entre el 40 y el 65 % de la proteína total;
- (ii) una segunda parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre 30 y 10 kDa, en el que la segunda parte representa entre el 10 y el 40 % de la proteína total; y
- (iii) una tercera parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre 10 y 5 kDa, en el que la tercera parte representa entre el 5 y el 30 % de la proteína total.

En una realización de acuerdo con la invención, el aislado de proteína obtenido mediante el proceso tiene una concentración de proteína soluble de al menos el 90 %.

En otra realización, la proteína insoluble separada y recuperada en el proceso de preparación del aislado de proteína soluble se hidroliza usando enzimas para producir un producto que comprende aminoácidos y péptidos solubles.

En otra realización, el proceso comprende además mezclar la fase sólida con un disolvente acuoso y repetir la separación sólido/líquido de una a cuatro veces para recuperar más proteína soluble.

5 En una realización adicional, la proporción de la harina de semilla oleaginosa con respecto al disolvente acuoso es de entre 1:5 y 1:15 (p/p) de harina con respecto a disolvente, o de aproximadamente 1:8 a 1:15 (p/p) de harina con respecto a disolvente, o de aproximadamente 1:8 a 1:12,5.

10 En otra realización, la temperatura adecuada para la actividad de la fitasa está entre 20 °C y 65 °C, y el pH adecuado para la actividad de la fitasa está entre 4,5 y 7,5; preferentemente, la temperatura adecuada para la actividad de la fitasa es de aproximadamente 50 °C y el pH adecuado para la actividad de la fitasa está entre 4,8 y 5,2.

15 En una realización adicional, la separación sólido/líquido se realiza mediante centrifugación, opcionalmente, mediante una centrifuga de decantación. En una realización preferida, la centrifuga de decantación se opera a una fuerza g de entre 2.000 y 4.000 g. En una realización preferida, la fuerza g es de aproximadamente 2.500 a 4000. En una realización, la centrifuga de decantación se opera a una temperatura de entre 10 °C y 20 °C, o inferior a aproximadamente 20 °C, pero superior a aproximadamente 0 °C, o de aproximadamente 20 °C.

20 En otra realización, la separación de la fase líquida se realiza mediante centrifugación, por ejemplo, mediante el uso de una centrifuga de desgrasado, una centrifuga bifásica, una centrifuga trifásica, mediante centrifugas bifásica por orden o disposiciones similares. La centrifuga se puede operar a una fuerza g de entre 2.000 y 14.000 g, opcionalmente, a una fuerza g de entre 2.900 y 14.000 g.

25 En otra realización, la fase acuosa de proteína se somete a microfiltración (y diafiltración), ultrafiltración y/o ultrafiltración seguida de diafiltración para recuperar una solución purificada de proteína.

Como se usa en el presente documento, en una realización preferida, el disolvente acuoso es agua, que puede ser agua corriente, agua destilada o preferentemente agua procesada usando ósmosis inversa (OI).

30 En una realización adicional, el proceso puede ser un proceso discontinuo, un proceso semicontinuo, un proceso continuo o cualquier combinación de los mismos.

35 En una realización, el aislado de proteína comprende menos del 2 % (p/p) de aceite: En una realización adicional, el aislado de proteína comprende al menos el 90 % (p/p) en una base de peso en seco.

40 Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, a la vez que indican realizaciones preferidas de la invención, se dan meramente a modo ilustrativo, puesto que, a la luz de la presente descripción detallada, diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y del alcance de la invención se harán evidentes para los expertos en la materia.

Breve descripción de las figuras

Las realizaciones de la divulgación se describirán en relación con las figuras, en las que:

45 La Figura 1 es un gráfico que demuestra la relación entre la pureza de una proteína secada por pulverización y la temperatura durante la centrifugación con decantador;
La Figura 2 es un gráfico que muestra el cambio en el flujo durante la ultrafiltración durante el tiempo de funcionamiento;
50 La Figura 3 es una fotografía que muestra el polvo procesado en el laboratorio/secado por pulverización en comparación con dos lotes previos de proteína producida de manera continua;
Las Figuras 4A y 4B representan un diagrama de flujo de un solo proceso, que es un diagrama esquemático que muestra las diversas etapas de separación de la torta prensada de canola en las partes insoluble y soluble;
La Figura 5 es un gráfico que compara el perfil de aminoácidos de una proteína hidrolizada con y sin tratamiento
55 de carbono; y
La Figura 6 es un gráfico que ilustra la contracción de aminoácidos y de material sin aminoácidos mediante tratamiento con carbono, que se muestra como Δ % del contenido inicial de cada aminoácido.

Descripción detallada

Definiciones

65 La expresión "harina de semilla oleaginosa", como se usa en el presente documento, se refiere a una harina preparada a partir de una semilla oleaginosa en la que la semilla oleaginosa ha sido molida y triturada para formar una harina, y de la que no se ha eliminado aceite; u, opcionalmente, se ha prensado la semilla oleaginosa para eliminar el aceite contenido en el interior para formar una harina denominada "torta prensada" o una "harina

parcialmente desgrasada". Opcionalmente, la harina se puede prensar para retirar el aceite dejando una torta prensada con un contenido de aceite reducido. El prensado de la semilla oleaginosa produce un aceite prensado y una harina parcialmente desgrasada que contiene del aproximadamente 15 % al aproximadamente 50 % de proteína en una base de peso en seco y del aproximadamente 5 % al aproximadamente 20 % de aceite, o aproximadamente al menos aproximadamente el 9 %, o aproximadamente del 10 % al 20 %, opcionalmente aproximadamente del 14 % al 16 %, en una base de peso en seco. Una harina desgrasada (que se ha extraído con disolvente) normalmente tendrá un contenido de proteína del aproximadamente 25 % al aproximadamente 55 %, opcionalmente del 30 % al aproximadamente 50 %, adecuadamente del aproximadamente 35 % al aproximadamente 50 %, y un contenido de aceite del aproximadamente 0,5 % al aproximadamente 4 %, opcionalmente del aproximadamente 1 % al aproximadamente 3 %, en una base de peso en seco. La semilla oleaginosa (o harina de semilla oleaginosa) antes de su prensado tiene un contenido de aceite del 40 % al 50 %.

La expresión "disolvente acuoso", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier disolvente en el que el agua comprende la mayor parte del disolvente (normalmente del aproximadamente 80 % al 99,9 % de agua en peso) o agua pura. El disolvente acuoso opcionalmente comprende, consiste esencialmente en o consiste en agua. Mientras que el agua pura puede comprender agua potable, preferentemente, comprende agua procesada, tal como agua desionizada, destilada o agua de OI (agua sometida a tratamiento de ósmosis inversa), agua ácida o agua alcalina sin disolvente orgánico ni sal añadida presente. Una excepción puede ser la adición de pequeñas cantidades de compuestos ácidos, básicos o tampón para ajustar el pH. El disolvente acuoso forma una suspensión y/o una mezcla cuando se pone en contacto con una harina de semilla oleaginosa. Por lo general, el disolvente acuoso está libre de disolventes orgánicos, tales como metanol, propanol, isopropanol, tetrahidrofurano, etc., ya que estos disolventes no son deseables como residuos en un producto proteico para consumo humano. Sin embargo, si hay disolventes orgánicos presentes, por ejemplo, etanol, forman parte del disolvente acuoso en pequeñas cantidades (por ejemplo, normalmente igual o inferior al 20 %, 15 %, 10 %, 5 %, 2 % o 1 %), de manera que su presencia en el producto final puede reducirse a una cantidad aceptable o insignificante. Un experto en la materia entenderá que el agua potable puede contener minerales naturales, sales y/u otros solutos que no afectarían el proceso de la divulgación.

La expresión "aislado de proteína", como se usa en el presente documento, se refiere a una harina de semilla oleaginosa que se ha tratado usando los procesos de la presente divulgación para aumentar el contenido de proteína, donde el aislado de proteína tiene un alto contenido de proteína soluble superior al aproximadamente 85 %, pero preferentemente del 90 % o más del 90 % de proteína en una base de peso en seco. El resto puede comprender hidratos de carbono, cenizas y aceite.

El término "suspensión", como se usa en el presente documento, se refiere a la harina de semilla oleaginosa que se ha mezclado con un disolvente acuoso para formar un líquido que contiene proteína disuelta y una suspensión de proteína, aceite y, opcionalmente, compuestos de fibra y antinutricionales, en el líquido.

La expresión "adecuadas para la actividad de la fitasa", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones tales como la temperatura y el pH, incluyendo, opcionalmente, el período de tiempo, en las que la enzima fitasa puede hidrolizar los grupos fosfato del fitato o ácido fítico para reducir la cantidad de fitatos o ácido fítico de la mezcla. En una realización, la temperatura adecuada para la actividad de la fitasa está entre 20 °C y 65 °C, opcionalmente entre 40 °C y 55 °C, más adecuadamente entre 50 °C y 55 °C. En otra realización, el pH adecuado para la actividad de la fitasa está entre 2,0 y 7,0, opcionalmente entre 4,0 y 6,0, más adecuadamente entre 4,8 y 5,2 u, opcionalmente, entre 5,0 y 5,5. En otra realización, la concentración de la enzima fitasa es inferior al aproximadamente 2 % (p/p) basada en el peso de la harina de semilla oleaginosa y, opcionalmente, del 0,5 % al 1,5 % o del 1,0 al 1,5 %, y puede ser tan baja como del 0,01 % y del 0,1 %, dependiendo de la concentración de ácido fítico de la harina. Se entenderá que las condiciones adecuadas para la actividad de la fitasa se aplican a todos los procesos de la presente divulgación.

La expresión "fase líquida", como se usa en el presente documento, se refiere al disolvente acuoso de la suspensión en la que se ha disuelto la proteína soluble de la harina de semilla oleaginosa, junto con otras sustancias solubles tales como cenizas, minerales, etc. Además, una parte del aceite presente en la harina de semilla oleaginosa puede estar presente en el disolvente acuoso durante el proceso de separación.

La expresión "fase sólida", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos insolubles, tales como proteína, fibra y aceite insolubles que no son solubles en el disolvente acuoso, y que forman una fase sólida que puede contener aceite líquido tras la separación.

La expresión "separar la suspensión con una separación sólido/líquido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proceso de separación sólido/líquido que sea capaz de separar la suspensión en una fase sólida y una fase líquida. Por ejemplo, el uso de una centrifuga, tal como una centrifuga de decantación, de prensado, tal como usando una prensa de tornillo, prensa de filtro, prensa de cinta, prensa francesa, etc., de sedimentación o de cualquier otro medio que separe la suspensión en una fase sólida y una fase líquida. Un experto en la materia conocerá diferentes técnicas, procedimientos y equipos que pueden ser adecuados para separar los líquidos de los sólidos o cualquier otro medio que separe la suspensión en una fase sólida y una fase líquida.

La expresión "separar la fase líquida", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proceso que sea capaz de separar dos líquidos que tengan diferentes densidades o solubilidades como, por ejemplo, una centrífuga trifásica, que es capaz de separar el aceite y la fase acuosa de proteína de la fase líquida (es decir, 2 fases que tienen densidades diferentes).

Los términos de grado tales como "esencialmente" y "aproximadamente", como se usan en el presente documento, significan una cantidad razonable de desviación del término modificado, de manera que el resultado final no se cambie significativamente. Estos términos de grado deben interpretarse como que incluyen una desviación de al menos $\pm 10\%$ del término modificado, sin que dicha desviación anule el significado de la palabra que modifica.

Procesos que incorporan las características de la invención

La presente divulgación se refiere a un proceso acuoso de preparación de un aislado de proteína. En una realización, cuando la harina se añade al disolvente acuoso, el aceite de la harina de semilla oleaginosa se separa de la proteína soluble, y se separa principalmente de la misma con la fase de sólidos. En una realización adicional, la extracción de proteína de la proteína soluble mediante el disolvente acuoso se ve relativamente poco afectada por la presencia de parte del aceite, que puede llevarse junto con el disolvente acuoso. En otra realización, el aceite que permanece con el disolvente acuoso en el proceso de la presente divulgación flota sobre la superficie del disolvente acuoso tras un proceso de separación, por ejemplo, mediante centrifugación, y, a continuación, se retira usando los procesos de separación de la presente divulgación.

Por consiguiente, en una realización de la divulgación, el aislado de proteína contiene menos del 2 % (p/p) de aceite:

El proceso de producción de un aislado de proteína a partir de una harina de canola o de colza de acuerdo con la invención comprende:

- proporcionar una harina de semilla oleaginosa prensada en frío, estando la harina prensada en frío a una temperatura de 85 °C o inferior;
- mezclar una harina de semilla oleaginosa con agua para formar una suspensión;
- opcionalmente, tratar la suspensión con fitasa a una temperatura y a un pH adecuados para la actividad de la fitasa;
- separar la suspensión con una separación sólido/líquido para formar:
 - una fase líquida que comprende el disolvente acuoso, proteína soluble y aceite; y
 - una fase sólida;
- separar la fase líquida para formar:
 - una fase de aceite; y
 - una fase acuosa de proteína;
- someter la fase acuosa de proteína a filtración de membrana, obteniéndose una solución de proteína; y
- secar la solución de proteína, obteniéndose el aislado de proteína.

En otra realización, la fase líquida también comprende sólidos residuales (finos) que se eliminan usando una centrífuga de pulido, una centrífuga bifásica u otras técnicas de filtración o de tamizado adecuadas.

En otra realización, el proceso comprende además mezclar la fase sólida con un disolvente acuoso y repetir la separación sólido/líquido de una a cuatro veces para recuperar más proteína soluble.

En una realización adicional, la proporción de la harina de semilla oleaginosa con respecto al disolvente acuoso es de entre 1:5 y 1:15 (p/p) de harina con respecto a disolvente, o de aproximadamente 1:8 a 1:15 (p/p) de harina con respecto al disolvente, o de aproximadamente 1:8 a 1:12,5.

En otra realización, la temperatura adecuada para la actividad de la fitasa está entre 20 °C y 65 °C, y el pH adecuado para la actividad de la fitasa está entre 4,5 y 7,5; opcionalmente, la temperatura adecuada para la actividad de la fitasa es de aproximadamente 50 °C $\pm$ 5 °C, y el pH adecuado para la actividad de la fitasa está entre 4,8 y 5,2.

En una realización adicional, la separación sólido/líquido se realiza mediante centrifugación, opcionalmente, mediante una centrífuga de decantación. En otra realización, la centrífuga de decantación se opera a una fuerza g de entre 2.000 y 4.000 g, preferentemente de entre 3.000 y 4.000 g. Sin embargo, como alternativa, se pueden usar otras materias descritas en el presente documento, tales como el filtrado o el prensado. Además, también se podría usar la deshidratación usando tamices o filtros de deshidratación rotacionales o estacionarios seguidos del prensado para la separación sólido/líquido. Cuando la separación sólido/líquido se realiza usando una centrífuga de

decantación, se obtiene una fase líquida, y la fase líquida contiene opcionalmente sustancias insolubles o sólidos residuales, tales como proteínas insolubles residuales. En una realización, la fase líquida que contiene sólidos residuales se somete además a centrifugación usando una centrifuga de discos y, opcionalmente, dos centrifugas de discos en serie. En una realización, la primera centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 6.000 y 9.000 g, opcionalmente, de entre 8.000 y 9.000 g, y la segunda centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 8.000 y 12.000 g, opcionalmente, de 10.000 g. En una realización, la separación de la fase líquida se realiza mediante centrifugación. En otra realización, la separación de las partes componentes de la fase líquida se realiza usando, por ejemplo, una centrifuga de desgrasado, una centrifuga bifásica o una centrifuga trifásica. En una realización, la centrifuga bifásica es una centrifuga de discos. En una realización, la separación de la fase líquida se realiza mediante dos centrifugas bifásicas en secuencia. En otra realización de la divulgación, la centrifuga se opera a una fuerza g de entre 2.000 y 14.000 g, opcionalmente, a una fuerza g de entre 2.900 y 14.000 g, opcionalmente, de 6.000 g. Se ha de reconocer que estos son ejemplos de condiciones de funcionamiento sugeridas, y la composición del líquido que se va a separar puede necesitar el funcionamiento en condiciones diferentes o usando técnicas de separación distintas de una centrifuga para separar sólidos de líquidos o dos fases líquidas inmiscibles.

En otra realización, la fase acuosa de proteína se somete a una o más etapas de microfiltración, ultrafiltración y/o por diafiltración, no necesariamente en ese orden, para obtenerse una sustancia retenida que comprende una solución de proteína.

En una realización preferida de la divulgación, el disolvente acuoso comprende o consiste en agua. Sin embargo, el disolvente acuoso puede comprender una solución salina tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, que se muestra en la técnica para la separación de la canola, en combinación con las etapas de procesamiento únicas desveladas en el presente documento.

En una realización, el aislado de proteína comprende menos del 2 % (p/p) de aceite: En una realización adicional, el aislado de proteína comprende al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de proteína (p/p) en una base de peso en seco.

En una realización adicional, la semilla oleaginosa comprende canola (tal como *Brassica juncea* o *Brassica napus*), semilla de colza, semilla de mostaza, semilla de brócoli, semilla de lino, semilla de algodón, semilla de cáñamo, semilla de cártamo, semilla de sésamo o semilla soja, o una harina de semilla oleaginosa producida a partir de la misma, opcionalmente, de harina de canola.

En una realización adicional, el proceso puede ser un proceso discontinuo, semicontinuo, continuo o cualquier combinación de los mismos.

En otra realización, la fase sólida se seca y se extrae con disolvente para aislar el aceite.

PRODUCCIÓN DE TORTA PRENSADA DE CANOLA

En el presente documento, se describe un proceso de fabricación por trituración en frío que incorpora características de la invención para la producción de una harina de semilla oleaginosa de canola de bajo contenido de aceite, también denominada torta prensada, con proteínas esencialmente no desnaturalizadas para su procesamiento posterior con el fin de producir un aislado de proteína completamente soluble de > 80 % (bps), más preferentemente de > 90 % (bps).

La Tabla 1 enumera la diferencia entre el proceso de trituración en frío que incorpora características de la invención y las operaciones típicas de trituración con hexano y de prensado en frío descritas en la técnica anterior. La torta del proceso actual se sigue procesando después para producir un aislado de proteína sin el uso de disolventes orgánicos (tal como hexano) para eliminar el aceite que queda en la torta tras el prensado.

En el proceso de trituración en frío usado en el presente documento, se usa esencialmente el mismo equipo que el usado en instalaciones de trituración con hexano de la técnica anterior. Sin embargo, el tiempo de residencia (de 20 a 30 min frente a 45 a 60 min, tiempo de acondicionamiento total) y las temperaturas (60-70 °C y 80-85 °C frente a 100-105 °C y 105-115 °C, respectivamente) que se usan en el proceso de acondicionamiento de copos y en el proceso de prensado expuesto en el presente documento son significativamente diferentes de las instalaciones típicas de trituración con hexano. Estas diferencias de procesamiento dan lugar a una reducción o eliminación significativa de la desnaturalización, mientras que siguen proporcionando una torta prensada que contiene del 12 al 14 % de aceite en comparación con del 15 al 20 % de aceite para las operaciones de trituración con hexano, que también producen proteína desnaturalizada. Las instalaciones de prensado en frío de la técnica anterior usan menos equipo y etapas que el presente proceso de prensado en frío o las instalaciones de trituración con hexano, pero no alcanzan ni controlan la temperatura a niveles tan bajos como el presente proceso a baja temperatura.

TABLA 1

	Proceso de trituración en frío	Trituración con hexano de la técnica anterior	Prensado en frío de la técnica anterior	Proceso de trituración en frío	Trituración con hexano de la técnica anterior	Prensado en frío de la técnica anterior
				Temperatura (°C)		
Limpieza de las semillas	√	√	√	Ambiente		
Acondicionamiento previo	√	√		40-45	20-35	
Desmenuzamiento	√	√		40-45	20-35	
Acondicionamiento	√	√	√	60-70	100-105	95-105
Prensado	√	√	√	80-85	105-115	95-105
Rotura de la torta	√	√	√	√	√	√
Refrigeración de la torta	√		Opt.	25-40		
	Duración (min)			Torta con contenido de aceite (%)		
				Prensado completo	Prensado previo	Prensado completo
Limpieza de las semillas						
Acondicionamiento previo						
Desmenuzamiento						
Acondicionamiento	20-30	45-60	45-60			
Prensado				12-14 %	15-20 %	10-14 %
Rotura de la torta						
Refrigeración de la torta						

Con más detalle, las etapas del proceso son las siguientes:

- 5 **Recepción y almacenamiento de las semillas:** la semilla de canola (*B. napus*, *B. juncea*, *B. Rapa*) tiene un nivel de humedad inferior al 10,5 % medido según la guía de clasificación de granos de la Comisión Canadiense de Granos. La semilla se puede almacenar en silos hasta que se necesite para el proceso de trituración.

- 10 **Limpieza de las semillas:** el producto es transportado a un limpiador rotatorio para retirar el material foráneo por tamizado y aspiración, dirigiéndose el subproducto a un recipiente específico para el almacenamiento.

- 15 **Acondicionamiento previo:** la semilla se calienta previamente, opcionalmente, usando un acondicionador vertical. La semilla pasa sobre tuberías que se calientan con vapor de baja presión para calentar la semilla hasta 40-45 °C antes del desmenuzamiento. El acondicionamiento previo de la semilla, en particular, en invierno, cuando las temperaturas exteriores pueden estar por debajo del punto de congelación, reduce la fragmentación de la semilla que puede ocurrir durante el proceso de desmenuzamiento. El acondicionamiento previo produce un copo de calidad más adecuada que, a su vez, mejora el rendimiento y la eliminación del aceite en la prensa, mientras se reduce la cantidad de partículas finas que pasa a través de la prensa con el aceite. Las partículas finas excesivas en el aceite aumentan el coste del refinamiento del aceite y, debido a que las partículas finas contienen proteína soluble, también reducen el rendimiento proteico en el proceso de aislamiento de proteína. El equipo de procesamiento preferido es un acondicionador vertical de un diseño "First In First Out" (FIFO). El proceso de acondicionamiento previo es, en principio, similar al usado en una instalación de trituración con hexano. Sin embargo, en la industria de la trituración con hexano, las semillas normalmente se calientan solo hasta 20-35 °C. Se ha determinado, para la producción de un aislado superior, que un acondicionamiento previo hasta 40-45 °C produce una torta de menor contenido de aceite con un IDP (índice de dispersión de proteínas) superior, lo que indica una menor desnaturalización de las proteínas que cuando el acondicionamiento previo se realiza solo hasta a 20-30 °C.

- 30 **Desmenuzamiento:** para aumentar al máximo la recuperación de aceite, la semilla se tiene que romper físicamente antes de prensarla. Se exprime la semilla entera a una temperatura de 40-45 °C entre dos cilindros giratorios y se aplana hasta un espesor de aproximadamente 0,2 a 0,4 mm.

- 35 **Acondicionamiento:** a continuación, se calienta la semilla de canola en copos hasta 60-70 °C durante 1/2 hora (preferentemente, hasta 65 °C). Las temperaturas de acondicionamiento para la semilla en la industria norteamericana de trituración con hexano normalmente son de 100-105 °C con un tiempo de residencia típico de 45-60 minutos. El nivel de humedad de la semilla en copos que se requiere para un prensado óptimo en la industria de trituración con hexano es del 2,5 al 3,5 %, que es significativamente inferior al contenido de humedad del 6 al 7 % en la semilla acondicionada preferida para la operación de trituración y prensado en frío descrita en la actualidad. Los

niveles óptimos de humedad para un buen prensado pueden ser muy dependientes y específicos del tipo y del fabricante de la prensa, así como de la temperatura de funcionamiento de la prensa.

Prensado: a continuación, se prensa la semilla acondicionada para separar el aceite de la torta prensada. La prensa preferida (French Oil Mill Machinery Company, EE.UU.) no es típica de la industria de la tritución con hexano, porque tiene refrigeración tanto de eje como de jaula, y un cono ajustable. Por el contrario, dado que la industria de tritución con hexano opera a temperaturas mucho más altas, no controlan las temperaturas creadas en la prensa y no usan refrigeración de eje ni conos ajustables. Se cree que la empresa French Oil es la única empresa que fabrica una prensa con refrigeración de jaula. Sin embargo, el equipo de French Oil normalmente se usa en las operaciones de prensado en frío de la técnica anterior. En el proceso descrito en el presente documento, se cree que la refrigeración de eje ayuda a conseguir un menor contenido de aceite en la torta. De igual modo, la refrigeración de jaula ayuda a producir una torta de menor contenido de aceite, pero su principal ventaja es que mantiene la temperatura de la torta fría durante el prensado (nominalmente, un tiempo de residencia inferior a 5 minutos) y proporciona una viscosidad creciente del aceite, de modo que se pierde menos partículas finas a través de las jaulas de la prensa hacia la corriente de aceite. Una ventaja adicional es que es posible aumentar la eliminación del aceite aumentando el espaciamiento entre las jaulas sin aumentar la pérdida de partículas finas en el aceite, lo que, a su vez, aumentaría los posteriores costes de refinamiento del aceite. El cono ajustable permite una mayor flexibilidad en la optimización de las condiciones de prensado para lograr un bajo contenido de aceite en la torta, a la vez que se proporciona una torta superior con una IDP más alto.

Refinamiento del aceite: el aceite se procesa posteriormente para proporcionar un aceite de canola superdesgomado que se puede transportar largas distancias sin sedimentación de las gomas para su posterior procesamiento en aceite de canola de calidad alimentaria.

Rotura de la torta: se rompe la torta prensada para reducir el tamaño de partícula de modo que la torta se pueda transportar más fácilmente. La realización del proceso de ruptura antes o después de la refrigeración no cambia la calidad de las proteínas.

Refrigeración de la torta: se enfría la torta prensada hasta menos de 40 °C para alargar el tiempo en que la torta se puede almacenar en una tolva antes de ser transportada al subsiguiente proceso de aislamiento de proteína descrito a continuación. La refrigeración de la torta no es la que se usa normalmente en la industria de la tritución con hexano, pero probablemente es la usada por las operaciones de prensado en frío de la técnica anterior para mejorar la seguridad del almacenamiento de las tortas en silos antes del envío. Dependiendo del contenido de aceite, la no refrigeración de la torta puede dar lugar a un sobrecalentamiento durante el almacenamiento que, a su vez, puede producir una reducción de la calidad de la torta.

Como se ha señalado anteriormente, aunque existen algunas similitudes en el equipo y en las etapas de procesamiento con las operaciones de prensado con hexano o en frío de la técnica anterior, existen varias diferencias, en concreto, en la temperatura y en los tiempos de procesamiento, y estas diferencias son fundamentales para el contenido de aceite y la calidad de la proteína, en particular, la solubilidad de la proteína en la torta de semillas producida y la calidad del aislado preparado a partir de esta torta de semillas. Durante una operación de tritución con hexano, las proteínas se desnaturalizan en un mínimo de dos etapas del proceso típico de la técnica anterior;

- la etapa de acondicionamiento de los copos en la que la semilla en copos se calienta hasta 105 °C durante un período prolongado de tiempo, y
- el tostador desolventizante, donde la harina extraída con aceite de hexano se calienta con vapor vivo para eliminar el hexano residual.

El presente proceso no usa disolvente (hexano) para producir aislados y, por lo tanto, en ningún momento se tiene que aumentar la temperatura para recuperar ni eliminar el disolvente de la harina y/o proteínas. El proceso de acondicionamiento del proceso expuesto en el presente documento es, por lo tanto, esencialmente diferente de los procesos típicos de tritución con hexano y de las operaciones típicas de prensado en frío.

El proceso anteriormente descrito funciona por debajo de la temperatura de desnaturalización de las proteínas de la semilla oleaginosa. Por ejemplo, el proceso funciona por debajo de la temperatura de desnaturalización de la proteína cruciferina, lo que da lugar a poca o ninguna desnaturalización. La cruciferina es la proteína de canola con la menor temperatura de degradación térmica.

Las temperaturas se mantienen por debajo de 85 °C durante el proceso de tritución. Este estudio también apoya el hallazgo de que las operaciones típicas de tritución con hexano y de prensado en frío desnaturalizan significativamente las proteínas de la semilla.

Los datos proporcionados en la siguiente Tabla 2 confirman que el proceso descrito anteriormente causa poca o ninguna desnaturalización de las proteínas contenidas en las semillas de *Brassica juncea* o *Brassica napus*, que se

procesan de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

TABLA 2

ID de la semilla	Origen de la semilla	Humedad y sust. volátiles (%)	Proteína (%) Leco	IDP Leco (AOCS)	IDP Leco (AOCS) Sin desgrasar
Semilla 2011-10-12	<i>B. juncea</i>	7,1	42	33	19
Copo acondicionado previamente 2011-10-13	<i>B. juncea</i>	8,0	42	33	26
Copo acondicionado 2011-10-11	<i>B. juncea</i>	7,7	42	32	27
Torta prensada 2011-01-06	<i>B. juncea</i>	7,6	41	35	24
Semilla 2012-01-06	<i>B. napus</i>	6,5*	42	51	28**
Torta prensada 2012-01-08, 09, 10 (valor medio)	<i>B. napus</i>	8,1*	42	45	35
*Datos presentados tal cual (sin desgrasar); **media de dos cargas de semilla					

Estadísticamente, no hay diferencia en el análisis anterior del contenido de proteína y del índice de dispersabilidad de proteína (AOCS) desde la semilla hasta la torta prensada en la instalación de procesamiento descrita anteriormente, teniendo la torta prensada resultante un contenido de aceite del 12 al 14 %. La torta prensada caracterizada anteriormente se transformó posteriormente en un aislado de proteína como se describe a continuación.

Para determinar el IDP, todas las muestras se extrajeron con hexano y se secaron a temperatura inferior para garantizar que el contenido de aceite fuera inferior al 3 % y que no hubiera desnaturalización de las proteínas. El análisis de IDP se ve afectado por el contenido de aceite y reduce el IDP medido en las muestras con mayor contenido de aceite. Mientras que los resultados en la última columna de la Tabla 2 muestran variabilidad en el análisis de IDP en las muestras de semillas no desgrasadas, copos y torta prensada, la variabilidad en estas muestras es mayor que en las muestras desgrasadas. Todos los análisis anteriores fueron para muestras recogidas al mismo tiempo en los cuatro puntos designados en el proceso de trituración.

PROCESAMIENTO ACUOSO DE TORTA PRENSADA

Se encontró que cuando se añade harina con aproximadamente el 14 % de aceite a agua, el aceite permanece principalmente en la harina. Sin embargo, la extracción de proteínas por el agua no se ve afectada por la presencia de aceite en la harina, y se libera una fracción del aceite de la harina parcialmente desgrasada mediante la adición del agua usada para extraer la proteína soluble. Ese aceite entonces flota en la superficie del agua después de un proceso de separación.

Para extraer el aceite de la fase líquida como resultado de las fuerzas centrífugas aplicadas, se puede usar una centrífuga de desgrasado o dos centrífugas de desgrasado en serie. Se mezclaron la harina, el agua y la fitasa durante aproximadamente 1 hora. Se separó la suspensión en una fase de sólidos y una fase líquida, y se suministró la fase líquida a una centrífuga de desgrasado seguido del procesamiento usando pasteurización a corto plazo (HTST) a alta temperatura (70 °C), ultrafiltración (UF) y secado por pulverización (SD). La extracción se realiza usando solo agua como disolvente. Los diagramas de flujo mostrados en las Figuras 4A-B muestran esquemáticamente el proceso. Como se muestra en la Fig. 4A-B, se puede añadir microfiltración entre las etapas de extracción del aceite y HTST para reducir el aceite y el contenido insoluble del aislado secado por pulverización.

Este proceso proporciona la capacidad de procesar y producir rápidamente una cantidad significativa de proteína y reducir al mínimo las partículas finas, las emulsiones y eliminar la necesidad de recuperar el disolvente orgánico y evitar el parpadeo. Se usa una centrífuga apropiado, tal como el usado en la industria láctea o de los cítricos, preferentemente uno o dos colocados en serie, para desgrasar el aceite de la fase acuosa. También hay que tener en cuenta que el desgrasador se puede ubicar en cualquier etapa del proceso, incluso detrás del decantador y antes del sistema de UF.

Ejemplo 1

Se añadió a agua harina al 14 % procedente del proceso de trituración (harina:agua 7:1 (m/m)) y se decantaron los sólidos de los líquidos. La fase líquida tenía una fase amarilla flotante semisólida en la parte superior de la fase acuosa. Tras el secado de toda la fase acuosa, incluyendo la fase amarilla flotante, 100 ml de solución proporcionaron aproximadamente un 5 % de sólidos disueltos que contenían del 40 al 47 % de proteína coincidiendo con la harina extraída con hexano. El contenido de aceite de la fase acuosa en una base de peso en seco (bps) fue del 1,4 % al 9,4 %. Sin embargo, al retirar la fase de aceite amarilla que flota en la superficie antes del secado, el contenido de aceite de los sólidos disueltos, secos, se redujo hasta el 0,5-0,7 %. La cantidad de aceite presente en la muestra es de aproximadamente 30-50 mg en 5 gramos de muestra. Se encontró que la fase de aceite flotante amarilla podría eliminarse fácilmente mediante desgrasado u otras técnicas de eliminación de aceite, y después el

resto de sobrenadante podría procesarse a través de UF para producir un aislado de proteína con < 2 % de aceite.

Ejemplo 2

En una segunda evaluación, se añadieron 225 g de harina prensada en frío (que contenía aceite al 14 %) a agua a 50 °C (agua:harina 8:1 (m/m)) para formar una suspensión. Se mezcló la suspensión, se añadió fitasa al 0,6 % y se agitó la suspensión durante una hora. Al cabo de una hora, se ajustó el pH a 7 y después se decantó para eliminar los sólidos. Se centrifugó la fase líquida más, y se retiró la fase de aceite de la superficie de la solución. Se repitió el procedimiento anterior 4 veces, generando 3,9 l de carga.

Se sometió a ultrafiltración la fase de agua decantada y desgrasada usando un sistema de UF (Millipore, membrana de corte de 10 kDa). Se redujo la fase acuosa en volumen a 500 ml (aproximadamente 8 veces la concentración) y después se sometió a diafiltración 4 veces con 2.800 ml de agua (700 ml por diavolumen). Se mantuvo la materia retenida/carga de UF a 40 °C durante la concentración y la diafiltración. Después de vaciar las líneas de UF y la carcasa de la membrana, se obtuvo un total de 700 ml de materia retenida.

Se enfrió la materia retenida durante la noche a 2-8 °C y luego se secó por pulverización (Buchi, secador de pulverización a escala de laboratorio). Las condiciones típicas de secado por pulverización eran una temperatura de entrada de 180 °C y una temperatura de salida de >70 °C. Se obtuvo un total de 23,8 gramos de polvo. (Se perdió una cantidad considerable de producto final en el secador por pulverización debido a la pequeña cantidad de carga al secador por pulverización y las pérdidas debidas al material retenido en el secador de pulverización de uso general, de escala de laboratorio). El análisis aproximado de este polvo se muestra en la Tabla 3.

TABLA 3

Análisis aproximados	
Proteína (bps)	98 % (91 % tal cual)
Ceniza	ND
Aceite	1,6 %
Fibra	ND
Humedad	6,7 %

El polvo de proteína era de color castaño claro con un aroma mínimo y tenía un ligero sabor amargo no persistente.

Se repitió la técnica de desgrasado que condujo a este resultado final varias veces con los resultados mostrados en la Tabla 4.

TABLA 4

	Antes del desgrasado (mg de aceite/g de sólidos) [% de aceite]	Después del desgrasado (mg de aceite/g de sólidos) [% de aceite]
1	55 [5,8 %]	6 [0,7 %]
2	55 [5,8 %]	6 [0,7 %]
3	91 [9,1 %]	5 [0,6 %]
4	94 [9,4 %]	6 [0,6 %]

Se encontró que la fase de aceite flotante se puede eliminar de manera eficaz y continua a través de un proceso continuo, tal como una centrifuga de zumos de cítricos o de productos lácteos, o un dispositivo similar. El proceso tiene varias ventajas: 1) tiempo total de residencia corto en la planta (previo al secado por pulverización), 2) sin disolvente y 3) permite la producción continua de proteína soluble de alta calidad.

Como se muestra en la siguiente Tabla 5, las semillas de *Brassica juncea* y *Brassica napus* proporcionan productos de aislados de proteína comparables cuando se procesan usando los procesos de la presente divulgación.

TABLA 5

Análisis SPEC de proteínas	Unidades	SPEC	<i>juncea</i>	<i>napus</i>
Proteína (bps)	%	≥ 90	90,6	90,9
Proteína (tal cual)	%	≥ 85	85,9	86,1
Proteína soluble en bruto (tal cual)	%		85,7	86
ÍNDICE de Proteína en bruto soluble (CP)	%		99,81	99,86

Humedad de sust. volátiles	%	< 7	5,15	5,25
Grasa (contenido de aceite) Tubo sueco	%		2,06	1,56
Cenizas	%	< 4	3,8	1,6
Recuento aeróbico de placa (SPC)	ufc/g	< 10.000	140	2200
<i>E. coli</i>	ufc/g	-/10 g	-	-
<i>Salmonella</i>	ufc/g	-/25 g	-	-
Análisis SPEC de proteínas	Unidades	SPEC	<i>junceae</i>	<i>napus</i>
Levadura y moho	ufc/g	< 100	10	10
Levadura	ufc/g		-	-
Moho	ufc/g		-	-
Aspecto del polvo		castaño		
Colorimetría (en seco)	Hunter	>L 70	66,95	63,83
Colorimetría (Líquido al 1 % a pH 7)	Hunter	>L 40	60,60	55,59
Densidad aparente (agua corriente)	g/ml	>L 0,25	0,262	0,289
Paso a través de malla 80 de EE.UU.	%	>90	95	95
Densidad aparente	g/ml	>,25	0,176	0,193

Uso de enzimas de procesamiento para eliminar sustancias insolubles

5 En un proceso preferido, se usan enzimas para destruir la fibra soluble y otras entidades no relacionadas con proteínas (celulosa, hemicelulosa, pectina, etc.) para que puedan eliminarse fácilmente. Estos componentes pueden producir un producto final con niveles de proteína > 90 %. Las enzimas se usan para romper estos materiales no deseados de modo que puedan pasar a través de la membrana de UF (10.000 Da). Con este fin, se evaluaron dos enzimas, la cristalzima y la validasa. Un experto en la materia, basándose en las enseñanzas del presente documento, reconocerá que también se pueden usar otras enzimas que actúen de forma similar.

10 La validasa TRL es un sistema enzimático de múltiples componentes producido por la fermentación controlada de una cepa no modificada genéticamente de *Trichoderma longibrachiatum* (también conocida como *T. reesei*). El sistema enzimático incluye un complejo de múltiples celulasas y hemicelulasas que hidrolizan y despolimerizan (descomponen) los hidratos de carbono estructurales y no estructurales (polisacáridos) de alimentos y piensos derivados de plantas (galactosidasa, glucanasas, mananasa y xilanasas).

15 La cristalzima PMLX es un sistema enzimático patentado producido por las fermentaciones controladas de cepas no modificadas genéticamente de *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei*. El sistema enzimático incluye pectinasas, celulasas, hemicelulasas y arabinasa. La cristalzima PMLX hidroliza y despolimeriza (descompone) la pectina de frutas y vegetales, y otros polisacáridos complejos seleccionados.

20 Se añadieron las enzimas cristalzima y validasa de calidad alimentaria a la suspensión en la misma etapa del proceso que la adición de fitasa. Ambas enzimas (validasa y cristalzima) tienen actividad máxima a pH 5 y a una temperatura de 53 ± 2 °C, lo que coincide con las condiciones operativas para el uso de la fitasa. Como evaluación inicial, basada en la dosificación sugerida en la literatura del producto, se añadió una dosis inicial de 800 ml de cristalzima a una sola carga de suspensión en el extractor. Aunque un análisis de los datos en proceso no mostró una mejora en el rendimiento del decantador con esta enzima a este nivel de dosificación, hubo una ligera mejora en la pureza de las proteínas. Como alternativa, también basándose en las recomendaciones de dosificación publicadas sobre el producto, se añadieron 100 ml de validasa a la carga de suspensión del extractor del mismo tamaño. En contraste con la cristalzima, la validasa proporcionó una mejora en el rendimiento del decantador, como lo demuestran los datos en proceso, y la pureza de la proteína se aumentó en aproximadamente un 2 % (hasta el 86 % (bps)) con respecto a los valores basales.

30 También se encontró que las temperaturas en el proceso de decantación afectaron a la pureza del producto final con temperaturas superiores a 40 °C, en comparación con el funcionamiento del decantador a <20 °C, reduciendo la pureza de la proteína por debajo del 80 %. La Figura 1 muestra la relación de la temperatura de funcionamiento del decantador con la pureza del producto final manteniendo constantes las propiedades de carga de la suspensión al decantador y las condiciones de procesamiento aguas abajo. Basándose en ello, cuando se redujo la temperatura de decantación primaria a <20 °C, los niveles de pureza de proteína en el producto final fueron > 86 %.

40 La presencia de componentes insolubles procedentes de una corriente del proceso tendrá un efecto sobre la pureza del producto final producido, en el que solo se desean los componentes solubles. También se sabe que la

decantación (o centrifugación en general) se ve afectada por la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso de decantación, porque la temperatura afecta a la viscosidad de la solución, lo que, a su vez, afecta el rendimiento de la centrifugación. A medida que disminuye la temperatura, la viscosidad aumenta y, como tal, la capacidad de las partículas insolubles para moverse a través de la solución bajo la influencia de la fuerza G se reduce por la mayor viscosidad a la temperatura inferior. Esto, a su vez, afecta a la capacidad de una centrífuga continua para eliminar las partículas insolubles, afectando así negativamente a la pureza. Por otro lado, el aumento de la temperatura reduce la viscosidad, mejorando así la eliminación de las partículas insolubles. Por esta razón, los fabricantes de centrífugas normalmente recomiendan ejecutar un proceso a la temperatura más alta posible con el fin de aumentar al máximo el rendimiento de separación.

Siguiendo la recomendación de fabricación de la centrífuga y aumentando la temperatura de decantación primaria para aprovechar la mejora de la eliminación de los sólidos insolubles, se mejoró la eliminación de los sólidos insolubles. Sin embargo, la pureza del producto final se redujo debido a que la temperatura elevada hizo que más de los sólidos insolubles no deseados se disolvieran y se llevaran al producto final, reduciendo así la concentración de proteína en ese producto final. Este resultado fue inesperado.

Se descubrió que, a medida que disminuía la temperatura durante la decantación primaria, la pureza del producto final mejoraba y la tendencia era lineal. Se produce un mejor equilibrio de la operación de decantación con la pureza cuando la decantación primaria se lleva a cabo a 18 °C. Cuando la operación de decantación se realiza por encima de 25 °C, la pureza del producto se reduce a menos del 80 %, como se muestra en la Fig. 1. Los dos puntos a temperaturas inferiores (temperatura del decantador <20 °C) con una pureza inferior al 80 % fueron el resultado del procesamiento de una muestra de corriente de carga con una mayor concentración de impurezas y de los problemas con la eliminación de aceite en equipos aguas abajo, y no son indicativos de la relación entre la temperatura de funcionamiento del decantador y la pureza del producto final.

SUMINISTRO DE FITASA

Los fitatos encontrados en los materiales vegetales son un factor antinutricional que se puede destruir usando la enzima Fitasa. La evaluación descrita a continuación presenta estudios realizados para comparar el uso de la Fitasa BASF con la Fitasa Kosher, de grado alimentario DSM, y determinar los niveles de dosificación, las temperaturas, los tiempos de procesamiento y otras variables de proceso para el uso de la Fitasa DSM para la reducción o eliminación del fitato en los productos finales. La comparación, realizada inicialmente en la suspensión liofilizada, se muestra en las Tablas 6-12.

Las muestras se generaron calentando el agua a 52 ± 2 °C, añadiendo al agua una harina parcialmente desgrasada, y luego añadiendo una cantidad predeterminada de fitasa a la suspensión. Se usaron 15 minutos de mezcla vigorosa para crear una suspensión antes de añadir la fitasa. A cada dosis, se evaluaron los tiempos de residencia de 30, 60, 90 y 120 minutos. Como referencia, se preparó una muestra de control de acuerdo con lo anterior (manteniéndola durante 1 hora), pero sin la adición de fitasa. La muestra de control tenía un nivel de fitato del 2,9 %.

Tabla 6

Niveles de fitatos, %						
	DSM	BASF*	DSM	BASF*	DSM	BASF*
Dosis de fitasa, %	0,3		0,6		1,0	
30 minutos	2,5	2,8	1,6	2,3	1,4	2,4
60 minutos	2,4	2,5	1,6	2,3	1,5	2,1
90 minutos	2,0	2,3	1,5	2,1	1,5	2,1
120 minutos	1,7	2,5	1,3	1,9	1,3	1,9
*La dosis de fitasa BASF fue en realidad del 0,2 %, y no del 0,3 %, debido a las diferencias en la concentración: 10.000 FTU de BASF/g frente a 5.000 FTU de DSM/ml. La concentración de material BASF es el doble que la de DSM, de manera que la cantidad de material DSM administrada debe duplicarse para suministrar la misma cantidad de FTU a la reacción. De acuerdo con DSM, 50 mg de enzima tienen 100 FTU. De este modo, se añadió eficazmente la misma cantidad de enzima. En todos los demás casos en los que se ha realizado una comparación directa (Tablas 6-8), la cantidad eficaz de enzima añadida es la misma.						

La Tabla 7 presenta los valores de la Tabla 6 comparando la Fitasa DSM y la Fitasa BASF a cada nivel de dosis tras una hora de reacción.

Tabla 7

Comparación de niveles de fitatos a 1 hora			
	0,3 %	0,6 %	1 %
DSM	2,4	1,6	1,5
BASF	2,5	2,3	2,1

En términos de rendimiento, existe una diferencia marginal entre la dosis de Fitasa DSM del 0,3 %, pero existe una diferencia entre el 0,6 % y el 1 %, lo que indica que una dosis adecuada es de entre el 0,6 y el 1 % para la mayor reducción de fitato. La suspensión sigue conteniendo fitato recalcitrante que no fue atacado ni destruido por la enzima cuando se suministró como se ha descrito anteriormente. Un experto en la materia reconocerá que DSN y BASF son ejemplos de fitasa adecuada. También hay disponibles otras fuentes de fitasa.

Para seguir abordando el fitato recalcitrante, se centrifugaron y se analizaron las muestras tratadas. Durante la centrifugación de los sólidos, se encontró que los niveles de fitato se redujeron drásticamente. La Tabla 8 muestra que el nivel de fitato en el líquido extraído en comparación con el nivel de fitato en suspensión usando la fitasa DSM fue aproximadamente la mitad de la de la suspensión.

Tabla 8

Dosificación de líquido frente a suspensión durante 1 hora		
Dosis	Suspensión	Líquido extraído
0,3 %	2,5	1,2
0,6 %	1,6	0,7
1 %	1,5	0,6

También se encontró que el tiempo de contacto de la harina y el agua antes de la adición de fitato tuvo un impacto en los niveles de fitato del producto final. Preferentemente, la harina se hidrata por completo para que el fitato de la harina entre en contacto con la fitasa con el fin de producir reacciones eficaces. Si se evita el contacto porque el agua no haya tenido acceso a todos los intersticios de la harina, entonces se producirá una reducción significativa en la reacción, y los niveles de fitato permanecerán altos. Por lo tanto, se prefiere un alto nivel de hidratación para la destrucción del fitato. Para evaluar el efecto del tiempo de contacto entre el agua y la harina, se mezcló la harina con agua durante varios períodos de tiempo antes de añadir la Fitasa DSM. Todas las muestras se trataron de la misma manera, siendo la única variable la cantidad de tiempo de mezclado antes de la adición de la fitasa.

La Tabla 9 muestra los niveles de fitato tras la ultrafiltración durante varios tiempos de hidratación diferentes antes de la adición de fitasa. Los niveles de fitato caen como resultado de la hidratación prolongada al aumentar el tiempo de incubación antes de la adición de la fitasa.

Otro aspecto es que la Fitasa BASF, un polvo granulado, se debe disolver y dispersar por completo para que se produzca una reacción adecuada. La velocidad de reacción puede verse afectada por una velocidad de disolución no uniforme debido a la dinámica del mezclado. Una mejor dinámica de mezclado (es decir, bombeo, cizalla, rotación de tanques, etc.) produce una dispersión de la fitasa más rápida y una mayor extensión de la reacción. El suministro de la fitasa en forma de líquido (Fitasa DSM) no padece los problemas de dispersión encontrados con fitasa sólida.

Tabla 9

Niveles de fitatos tras el procesamiento por UF	
Tiempo de mezclado antes de la adición de la fitasa	% de fitatos
15 minutos	0,53
2 horas	0,49
4 horas	0,37

Basándose en los datos anteriores, hay fitato recalcitrante en la suspensión después del tratamiento. Después de la centrifugación, el nivel de fitatos en la corriente líquida es aproximadamente la mitad del de la suspensión, y la cantidad de fitato cae aproximadamente a la mitad tras la concentración en la UF.

Se evaluó la evaluación adicional de los ajustes realizados en otras etapas del proceso a escala completa para determinar la eficacia en la resolución de los resultados de los fitatos > 1 % en el producto final.

Ejemplo 3

Para estas evaluaciones, se usó una suspensión de agua con respecto a la harina de 10:1. La suspensión de harina se agitó sobre la placa caliente durante aprox. 1 hora a ≤ 52 °C para descomponer completamente la harina. La Tabla 10 muestra las etapas de calentamiento, adiciones de fitasa, tiempo de retención, ajustes de pH, etc. Se usaron diferentes cantidades de fitasa para tener en cuenta las diferentes concentraciones de cada proveedor. La primera y segunda columnas comparan la misma concentración de fitasa de las dos fuentes. La tercera columna proporciona datos para DSM usando un método diferente de adición, es decir, la fitasa se añadió al agua de OI o a la suspensión y a una temperatura ligeramente superior (≤ 58 °C). Tras la digestión, se centrifugaron las suspensiones para separar la fracción de harina del sobrenadante. Se centrifugaron muestras de 250 ml a 4000 rpm (2.700 g) durante 10 minutos usando una centrífuga Thermo Scientific, Modelo CL31. A continuación, se analizó el

sobrenadante para el fitato (ácido fítico) sobre una base líquida "tal cual".

Tabla 10

Etapas del proceso			
Etapas	BASF (10.000 g) Granular	DSM (5.000 l) Líquido	DSM (5.000 l) Líquido (con agua de OI)
Agua (g)	401,06	402,87	400,60
Temp (°C)	---	---	58
Adición de fitasa (g)	---	---	0,210 g
Tiempo de retención (h)	---	---	1 h
Harina (g)	40,07	40,31	40,27 g
Temp (°C)	52	52	58
pH (Inicio)	5,79	5,76	5,74
pH 5,0 (ajustado con ácido cítrico al 10 %)	8 ml	8 ml	5 ml
Adición de fitasa (g)	0,1244	0,2422 g	---
Tiempo de retención (h)	1 h	1 h	1 h
pH (Fin)	5,41	5,39	5,23
pH 7,0 (con NaOH 0,2 N)	78 ml	78 ml	80 ml
Centrifugación/decantación	sí	sí	sí
Resultados:			
ID de la muestra (líquido sobrenadante)	JF-02-143-BASF	JF-02-143-DSM	JF-02-143-DSM-OI
Fitasa (ácido fítico) tal cual	0,37 %	0,35 %	0,39 %

5 En una realización, el proceso utiliza Fitasa DSM.

Se realizaron los siguientes cambios sobre el procedimiento anterior:

- 10 1) Orden de la adición: la enzima se añadió tras la adición de la harina al agua de OI, porque la harina agrega iones al agua. Anteriormente, la enzima se añadía al agua de OI a la temperatura previa a la adición de la harina. Sin embargo, el agua de OI es no iónica, lo que puede causar estrés a la enzima y desnaturalizar potencialmente la enzima volviéndola inerte.
- 15 2) Temperatura del agua de OI: la temperatura del agua añadida a los extractores se redujo HATA 53 ± 2 °C. La temperatura óptima de la enzima es de 55 °C, entendiéndose que es mejor que sea inferior a 55 °C que superior. En los procedimientos anteriores, la temperatura tendió a ser de 56-60 °C, que estaba por encima de la temperatura óptima para la actividad enzimática.
- 20 3) Se añadió una etapa al proceso para reducir el pH de la suspensión a $5 \pm 0,2$ antes de la introducción de la enzima. Este cambio sitúa a la enzima en un ambiente donde la enzima es más activa.
- 4) Debido a que la cantidad de fitato en la harina puede variar, se controlan los niveles de fitato en la carga y la cantidad de enzima ajustada para mantener el nivel de fitato en el producto final por debajo del 1 %.

25 Filtración para la eliminación de los fitatos

Una operación de unidad clave en el proceso con respecto a la pureza del producto es el sistema de UF/DF. Estas operaciones proporcionan los medios para eliminar los fitatos no unidos (es decir, no unidos a la proteína) de la materia retenida, dando lugar a un producto más puro. Para evaluar el efecto del sistema de UF/DF, se calentó el agua a 52 ± 2 °C y se añadió la harina parcialmente desgrasada. Se mezcló la harina hasta que se dispersó/suspendió adecuadamente. Se añadió fitasa al 6 % (v/p) y se mantuvo durante 1 hora a la temperatura indicada, y se retiraron los sólidos por centrifugación. Se lavó la harina con 2,5 veces la masa de partículas pesadas y líquidos extraídos combinados. Se concentró la muestra usando un dispositivo de ultrafiltración provisto de membranas de 10.000 MWCO, y después se sometió a diafiltración. Se retiraron las muestras antes de la concentración, después de la concentración y tras el procesamiento de cada diávolumen, y se ensayó el residuo de fitatos. Los datos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

Fitatos como resultado del procesamiento por UF	
	% de fitatos
Líquido extraído (tras la centrifugación)	0,5-0,7
Fracción concentrada extraída	0,25
Diavolumen 1 (materia retenida ensayada)	0,23
Diavolumen 5 (materia retenida ensayada)	0,22

La Tabla 12 muestra los resultados de los fitatos en el producto final antes y después de realizarse por completo los cambios anteriores, incorporando el lote 20110725 todos los cambios anteriores.

Tabla 12

Resultados de los fitatos de las muestras de producción					
Lote n.º	20110718	20110719	20110720	20110725	20110726
Fitatos, %	1,90	2,30	0,72	0,42	0,56

Evaluación de la Centrifuga trifásica (extracción del aceite)

Anteriormente, se había demostrado que el grueso de la grasa presente en la fase acuosa (aproximadamente 2-10 % del aceite en una bps de los sólidos en la fase líquida) se podía separar manualmente. Se evaluó una centrifuga continua, trifásica, para la eliminación continua del aceite (y la fase amarilla), que se había separado de una corriente acuosa de procesamiento generada mezclando harina y agua después de la extracción de los sólidos de la misma, con o sin desgrasado previo de la harina, y el producto que salía de la centrifuga era adecuado para la producción de un aislado de proteína tras la filtración, la diafiltración y el secado por pulverización posteriores. En general, los presentes inventores han demostrado que los contenidos de aceite de hasta el 10 % de aceite (bps) de los sólidos disueltos pueden desgrasarse de forma eficaz mediante el desgrasado manual tras una breve exposición a la fuerza G (aprox. 2.900 g).

El material de partida era semillas de canola, que se habían prensado en frío para alcanzar niveles de aceite del 14 y 18 %, respectivamente, en la harina. Se usó el control de temperatura para mantener la solubilidad nativa de la proteína (IDP = 30). Se añadió harina de canola (600 kg) a agua (4.200 l) a 50 ± 5 °C bajo buena agitación. Se añadió fitasa de calidad alimentaria (0,6 % v/p (harina)) y se mezcló la suspensión durante 1 hora. A continuación, se ajustó el pH a 7, y se retiraron los sólidos de la fase líquida usando una centrifuga de decantación continua. Después, se trató la fase líquida mediante HTST (72-74 °C) seguida de la eliminación de los sólidos insolubles residuales usando un clarificador de los sólidos del líquido (2 fases).

A continuación, se procesó el líquido, que contenía proteína soluble y aceite residual, a través de una centrifuga de desgrasado continuo de aceite que funcionaba en un modo trifásico (sólidos/líquido/líquido). Esto proporcionó una extracción adicional de los sólidos residuales, así como la eliminación del aceite residual de la fase acuosa. La fase acuosa contenía proteína y azúcar (aproximadamente 40-48 % de los sólidos presentes en el agua son proteínas y el resto son azúcar, cenizas y otros componentes solubles).

Ejemplo 4

Se emplearon dos materiales de partida diferentes: 1) torta prensada que contenía aceite al $14 \% \pm 1 \%$; y 2) torta prensada que contenía aceite al $18 \% \pm 1 \%$. El fin de esto era verificar que la carga de aceite entrante no afectara negativamente al proceso. También se evaluaron dos temperaturas diferentes 1) 15 ± 1 °C; y 2) 40 ± 1 °C para determinar si la temperatura desempeña un papel en la capacidad de eliminar el aceite y la eficacia de la eliminación del aceite. Los estudios de laboratorio previos mostraron que la separación por lotes de la capa de aceite por centrifugación y el desgrasado se vio facilitada por la temperatura más fría (véase la Tabla 13). Sin embargo, debido a que las centrifugas continuas suelen funcionar mejor a temperatura más caliente, esto se evaluó una vez más.

Tabla 13

Efecto de la temperatura en la eliminación del aceite del lote			
Muestra	Temperatura	Aceite extraído (mg/100 ml de solución de procesamiento)	% de aceite (bps) de sólidos
Control	Sin desgrasado	153	3 %
1	15 °C	6	0,1 %
2	40 °C	17	0,4 %
3	60 °C	14	0,4 %

También se investigó el número de pasadas a través de la centrífuga necesarias para llevar el nivel de aceite a un nivel aceptable. Las múltiples pasadas a través de la centrífuga indican el número de centrifugaciones que es necesario realizar en serie para mantener los procesos comerciales de una manera continua, de una pasada. Además, se investigó la velocidad del procesamiento. Cuanto más rápido se carga un material a la centrífuga, menor será el tiempo de residencia del material que pasa a través. La alícuota 1 comprendía la fase acuosa de la extracción acuosa de la torta prensada con un 14 % de aceite; la alícuota 2 era la fase acuosa de la extracción acuosa de la torta prensada con un 18 % de aceite.

En una primera operación, se equilibraron 400 l de alícuota 1 a temperatura de 15 ± 1 °C en un tanque con agitación. A continuación, se cargó el contenido en la centrífuga a una velocidad de 120 l/h. En el transcurso de la operación, el recipiente se limpió cada 45-60 minutos. Esto era necesario porque se observó que el nivel de sólidos era un problema y que los componentes internos de la centrífuga no permitían que la fase de aceite se retirara de forma continua. Esto permitió la eliminación de los sólidos y la eliminación del aceite acumulado. Algo de la parte superior de la fase líquida adyacente al nivel de aceite, que se separó con el aceite, se segregó y se devolvió al tanque para su posterior procesamiento. Se recogieron las partículas pesadas (que contenían sólidos insolubles y parte del aceite recogido en el cuenco) y se pesaron por separado. Se recogió toda la primera pasada a través de la centrífuga y se pasó a través de la centrífuga una segunda vez durante 60 minutos.

En una segunda operación, las condiciones eran las mismas, a excepción de que la cantidad de solución del proceso se redujo a 200 l y la temperatura se aumentó a 40 ± 1 °C. El recipiente se limpió cada 45-60 minutos y luego se repitió el proceso durante 60 minutos más. La velocidad de carga era de 120 l/h.

La tercera y la cuarta operación usaron 200 l de carga inicial de la alícuota 2 procesada a 40 °C y 15 °C, respectivamente. El cuenco se limpió tras 30 minutos de procesamiento, seguido de 1 hora para la segunda pasada.

Se recogieron muestras de las cargas (alícuotas 1 y 2) y durante el procesamiento para evaluar el efecto de la eliminación del aceite. Los resultados se tabulan a continuación (Tabla 14).

Tabla 14

Efecto de eliminación del aceite usando una centrífuga de desgrasado			
Muestra	Temperatura	Extracción de aceite (mg/100 ml de solución) ^d (pasada 1)	% de aceite (bps) de los sólidos (pasada 1)
Alícuota 1 (Control) ^a	Sin desgrasar	394	9,2
Alícuota 1	15 °C	6 (26)	0,2 (0,6)
Alícuota 1	40 °C	1	0,03
Alícuota 2 (Control) ^b	Sin desgrasar	144	3,3
Alícuota 2 – 15 °C	15 °C	(5)	(0,2)
Alícuota 2 – 40 °C	40 °C	4	0,1
^a Derivado de la torta prensada en frío al 14 % (el 14 % indica el aceite residual de la torta prensada). ^b Derivado de la torta prensada en frío al 18 % (el 18 % indica el aceite residual de la torta prensada). ^c Material antes de realizar la extracción del aceite. ^d Se muestran los datos de la pasada 2 a menos que se indiquen entre paréntesis. En el caso de las alícuotas 1 y 2, se omitió el muestreo de la pasada 1 para la condición de 40 °C. Tampoco se tomaron los datos de la pasada 2 para la alícuota 2, a 15° C.			

Los datos muestran claramente que la centrífuga de desgrasado de aceite elimina el aceite de forma eficaz de la corriente del proceso. A modo de comparación, la centrífuga de desgrasado de aceite eliminó el aceite a un nivel de 1 y 6 mg de aceite/100 ml de solución de proceso para 0,03-0,2 % de aceite (bps) de la proteína disuelta.

Estudios de filtración

Si bien se encontró que el desgrasado físico usando una centrífuga de múltiples etapas era un medio eficaz de reducir de manera significativa el aceite, se utilizó la filtración para retirar adicionalmente los sólidos no disueltos y el aceite restante de la proteína disuelta en la solución de extracción acuosa. Se encontró que la filtración subsiguiente usando un filtro Millipore fue eficaz en la eliminación del aceite traza mientras que se mantenía la pureza de la proteína. Se evaluó una serie de tamaños de filtro Millipore (0,22, 0,45, 0,65 µm) para el flujo, la permeabilidad a la proteína y la retención de aceite. En todos los ensayos, el volumen recuperado de la carga de entrada resultó variar del 83 a 93 % de la carga.

Ejemplo 5MF de 0,22 um (después de la carga mediante HTST):

5 Se concentraron 6,4 l de material 12,8 veces y se cargó a través de un filtro de 0,22 um. El filtro de 0,22 um retuvo el 100 % de los 4 g disponibles de aceite en la fracción retenida, dejando la fracción permeada con < 0,01 % de aceite (bps). Aunque el 57 % de la proteína disponible se transfirió a la fracción permeada, la disminución significativa del flujo (80 % de disminución en el flujo) resultó ser inaceptable. Sin embargo, se cree que la pérdida de flujo puede deberse al cambio de tamaño/estructura de las proteínas debido a la exposición a altas temperaturas mientras pasa a través de la unidad de pasteurización de HTST.

10 A continuación, se procesó la fracción permeada obtenida a partir de esta etapa de filtración a través de un sistema de UF de tamaño de laboratorio para eliminar los azúcares y otras impurezas, y se analizó la fracción retenida por UF resultante. Se obtuvo una concentración de 6 veces la carga de UF (fracción permeada de M.F). A continuación, se sometió la fracción retenida de UF a diafiltración con 4 diavómenes para eliminar los últimos restos de azúcares. A continuación, se secó el producto de la diafiltración por pulverización; el contenido de proteína resultó ser del 87,9 % (bps). Esto mostró una mejora significativa con respecto al material sin MF (mismo lote madre de solución del proceso) que tenía una pureza de solo el 76,5 % (bps).

20 Basándose en estos datos obtenidos usando el filtro de 0,22 um, se evaluaron otros tamaños de filtros Millipore para optimizar la combinación del flujo, de la recuperación de proteína y de las capacidades de retención de aceite.

MF de 0,45 um (antes de la carga tratada por HTST):

25 Primero se separó el 50 % de la materia insoluble de la carga usando una centrífuga de laboratorio. A continuación, se concentró el material de carga 12 veces. Basándose en los datos del ensayo, el filtro de 0,45 um retuvo prácticamente toda la cantidad disponible de 42 g de aceite del material de carga, ya sea en la fracción retenida o en el propio filtro, dejando un 0,21 % de aceite (bps) en la corriente permeada.

30 Primero se procesó el material de carga a través de un desgrasador Westfalia y luego se refrigeró durante la noche. La carga se concentró 12,8 veces. Aunque el filtro retuvo esencialmente la totalidad de los 3,4 g disponibles de aceite de la carga, resultando en el 0,20 % (bps) de la fracción permeada, solo se transfirió el 15 % de la proteína disponible a la corriente permeada debido al efecto de la pasteurización sobre el tamaño/la estructura de las proteínas.

MF de 0,65 um (después de la carga tratada por HTST)

35 Primero se procesó el material de carga a través de un desgrasador Westfalia y luego se refrigeró durante la noche. La carga se concentró 12,8 veces. El caudal disminuyó un 92 % durante la filtración de los primeros 3,5 l de material. El sistema se apagó tras procesar 4 l de material, ya que el flujo se había detenido por completo. Independientemente de ello, la corriente permeada solo contenía 0,4 g de los 2,4 g disponibles de aceite en la carga y el 47 % de la proteína disponible (bps). De nuevo, este bajo porcentaje de proteína se atribuyó a la muestra obtenida tras el HTST y, posiblemente, a la refrigeración durante la noche previa a la filtración.

MF de 0,65 um (antes del desgrasador/antes de HTST):

45 Ensayo 1: se redujo el caudal en un 55 % (de 200 ml/min a 90 ml/min) durante la filtración de 6 l de material. Sin embargo, se transfirió más del 95 % de la proteína disponible a través del filtro a la fracción permeada. Basándose en el balance de masa volumétrico, el material de carga se concentró 20 veces. El volumen perdido en el sistema fue de 500 ml (o del 8 %). Sin embargo, se transfirieron 4,3 g de aceite de los 34 g disponibles en la carga a la corriente permeada. Si bien se trata de una gran cantidad de aceite transferido en comparación con los otros ensayos, la carga también tenía un contenido de aceite mucho mayor que los materiales de carga de los otros ensayos de filtración.

55 Ensayo 2: una segunda muestra ensayada con el filtro de 0,65 um mostró una reducción del 80 % en el flujo a lo largo de los 6 l, y generó una concentración del material de carga de 14,6 veces. En cuanto a la pérdida de flujo, es importante señalar que este material de carga tuvo el nivel más alto de aceite, midiendo el 28 % (bps), lo que puede haber contribuido a la reducción del flujo. La materia retenida contenía aproximadamente el 6 % (bps) de la proteína disponible del material de carga, lo que indica que la filtración tuvo éxito en la transferencia del grueso de la proteína de la carga a la fracción permeada.

60 Ensayo 3: se centrifugó la solución del proceso refrigerada y se extrajo la materia oleosa de la superficie para reducir la cantidad total de aceite que pasaba a través del filtro Millipore. Esto redujo el aceite del 19 % al 5 % (bps). El caudal cayó en un 70 % desde el caudal de partida durante la filtración de 5,9 l de carga. El aceite transferido a la fracción permeada fue de 0,4 g de los 9,2 g disponibles en el material de carga (0,33 % bps), y la extracción de proteína a la fracción permeada fue del 72 % bps. Esta alta obtención de proteína también puede atribuirse, en

parte, a la mayor reducción en el volumen de carga en 14,8 veces, lo que transfiere más proteína a la corriente permeada. La refrigeración previa a la filtración puede haber causado la reducción de la eficiencia del sistema.

Ensayo 4: este material también se desgrasó antes de la filtración a través de MF. La carga desgrasada contenía el 9,22 % (bps) de aceite o 25,4 g/7,6 l. El flujo se redujo en un 69 % con respecto al caudal de partida de 61 ml/min durante la filtración de 7,6 l. La carga se concentró 12,6 veces. Se transfirió 1,0 g de aceite a la fracción permeada a partir de los 25,4 g disponibles en la carga (o el 0,53 % bps). Además, se transfirió el 70,0 % de la proteína de la carga soluble disponible satisfactoriamente a la corriente permeada durante la filtración.

En esta evaluación, la extracción del 70 % es inferior a la extracción del 95 % de las evaluaciones previas. Las diferencias notables fueron:

Volumen de carga: paso de un 20 % más de volumen a través del filtro MF por unidad de superficie.

Sólidos/Proteína: más sólidos (12 % (bps)) y 31 % (bps) más de proteína que en el ensayo 1.

Aceite: significativamente más aceite en 35 g que el ensayo 2 cargado solo con 25 g de aceite, la fracción retenida recuperada del ensayo 1 fue del 78 % del aceite disponible, mientras que, en el ensayo 2, solo se recuperó el 70 % en la fracción retenida. El ensayo 1 permitió que el 12,4 % del aceite disponible pasara a través a la fracción permeada con una pérdida total del 10 % al sistema, mientras que el ensayo 2 solo permitió la transferencia del 3,7 % del aceite disponible a la fracción permeada, pero mostró una pérdida del sistema del 27 % de aceite. Parece que el propio filtro de MF retuvo más aceite por unidad de superficie en el ensayo 2 que en el ensayo 1, lo que podría haber limitado la eficiencia del filtro de MF.

Basándose en lo anterior, a continuación, se describe la configuración, filtración, análisis y balance de masa de una evaluación con PVDF de 0,65 μ m (fluoruro de polivinilideno), filtro de MF, incluyendo el procesamiento adicional a través de la membrana UF antes del secado por pulverización. Este material de carga se generó en un funcionamiento continuo de la planta de producción en una proporción de 8:1 de agua con respecto a la harina. Como resultado de ello, no hubo ninguna etapa de refrigeración. Se añadió fitasa a un caudal del 1,2 % de adición de harina. La descripción anterior es un ejemplo de un equipo adecuado, tamaño de membrana y material de membrana. Sin embargo, el experto en la materia, basándose en las enseñanzas del presente documento, reconocerá que hay alternativas adecuadas que pueden proporcionar resultados similares.

Se recogió una muestra de 10 l y se procesó (antes de desgrasar/antes de HTST). El equipo usado comprendía:

Unidad de microfiltración Millipore Pellicon 2 Mini (UPP-U0.1 0,65 μ m), Membrana Durapore, material de PVDF, superficie de la membrana de 0,1 m²
 UF- Cartucho Prep/Escala TFF 6ft2, Poliétersulfona 10 K PTGC,
 Bomba- MasterFlex Modelo 77410-10 con una velocidad variable (de 33 a 650 rpm), y
 Centrífuga: Thermo Scientific CL-31.

Desgrasado: se centrifugó el material en alícuotas de 250 ml usando la centrífuga Thermo Scientific CL-31 a 4.000 rpm (2.700 g) durante 10 minutos. Se retiró con una pipeta cualquier materia oleosa de la superficie y se volvieron a mezclar los sólidos asentados en solución para su posterior procesamiento. Esto proporcionó aproximadamente 8 litros de material para procesamiento posterior.

Filtración Millipore: se calentó la solución tras el desgrasado hasta 52 °C ($\pm$ 2) en alícuotas de 2 l. El pH del líquido de ensayo fue de 7,44.

Velocidad de permeación (Caudal): la Figura 2 muestra el cambio en el flujo durante el tiempo de funcionamiento, que también es una función del volumen procesado. Como era de esperar, hubo una reducción significativa del caudal después del procesamiento de los primeros 3,5 litros, y el caudal se estabilizó a aproximadamente 20 ml/min mientras se procesaban los últimos 4 l. La Tabla 15 muestra los volúmenes de balance de masa (MF). Una pérdida calculada de aproximadamente 350 ml (4,6 %) se debió al material perdido en la tubería, por evaporación en la placa de cocción, etc.

TABLA 15

Volúmenes de MF		
Material de carga extraído (disco Alpha Laval)	7.600 ml	100,0 %
Fracción retenida por MF	600 ml	7,9 %
Fracción permeada por MF	6.650 ml	87,5 %

Ultrafiltración/Diafiltración: se calentó la fracción permeada por MF descrita anteriormente hasta aproximadamente 35 °C y se procesó a través de la unidad de UF. Se procesó un volumen total de 6.300 ml a través de la unidad de UF y después se sometió a diafiltración.

Secado por pulverización: se secaron por pulverización aproximadamente 600 ml de material y se recogieron todas las fracciones de la muestra para el análisis y el procesamiento adicionales. Los líquidos se ensayaron para determinar el contenido de proteína y se secaron muestras adicionales de volumen conocido en el horno a 90 °C antes de determinar los sólidos y el contenido de aceite en una base de peso en seco (bps). Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS								
Descripción de la muestra	Vol seco (ml)	% de sólidos (bps)	% de proteína (Liq.)	% de proteína (bps)	% de aceite (bps)*	Aceite (mg/100 ml)	Masa (g) de muestra seca para el análisis del aceite	Masa de aceite aislado (mg)
Solución del proceso	455	3-78	1,50	38,0	13,8	52	3,0088	42
Disco – desgrasado/centrifugado en laboratorio	475	3,62	1,35	39,3	9,22	33	3,0112	28
Fracción permeada de la MF – 0,65	135	2,71	1,17	38,6	0,53	1	1,0000	1
Fracción retenida de la MF – 0,65	405	10,23	4,00	40,6	28,8	295	3,0087	87

Balance de Masa de la MF (aproximado). La Tabla 17 muestra el balance de proteína y aceite del proceso de MF. Basándose en las pérdidas calculadas, el 100 % de la proteína soluble disponible se atribuye a las fracciones permeada o retenida. La proteína soluble disponible fue del 91,6 % de la proteína total en el material de carga del Alpha Laval. De esto, se transfirió el 70 % de la proteína soluble total disponible directamente a la corriente permeada mediante filtración MF. Además, al diafiltrar la fracción retenida de la MF, la proteína soluble extraída podría haber sido tan alta como de 76,5 g de los 99,3 g disponibles o de una recuperación del 77,0 %. Se pueden transferir otros 3,8 g (5,0 g de proteína x 77,0 % de recuperación) de proteína soluble de la pérdida de carga global en volumen a la fracción permeada. Además, se retiró más proteína mediante el muestreo de 135 ml de fracción permeada para el secado en el horno, correspondientes a otros 1,4 g de proteína. Los ensayos mostraron que la fracción permeada contenía aproximadamente el 4 % del aceite disponible que pasó a través de la membrana de MF a la fracción permeada, mientras que el 70 % del aceite se mantuvo en la fracción retenida por MF. Mediante el cálculo de la pérdida potencial de aceite a través de la pérdida de carga, se contabilizó más aceite al 4 %. Según un balance de masa, aunque solo se recuperó el 78 % del aceite total disponible del líquido de carga mediante el balance de masa, una gran parte del 22 % (5,2 g) que faltaba comprendía la retención de aceite en el filtro de MF.

Tabla 17

Balance de masa de MF (aproximado)				
Material	Proteína (g)	Proteína extraída (% en peso)	Aceite (g)	Aceite extraído (% en peso)
Carga (desgrasada en laboratorio)	108,4	100	25	---
Pérdidas de volumen de carga ¹				
Pérdida por la proteína insoluble ²	9,1	8,4	---	---
Proteína (soluble) disponible total ²	99,3	91,6		
Fracción permeada de MF	69,5	70,0	1,0	4
Pérdida en la corriente retenida ³	7,0	7,0	---	---
Muestra retirada ⁴	1,4	1,4	---	---
Pérdidas de volumen de carga ¹	3,5	3,5	---	---
Pérdidas totales incluyendo la fracción permeada	81,4	82,0	1,0	4
Fracción permeada de MF⁵	18,0	18,1	17,7	70
Pérdidas de volumen de carga ¹	1,1	1,1	1,1	4
Pérdidas totales incluyendo la fracción retenida	19,1	19,2	18,8	74
Proteína (soluble) extraída total (%)		101,3		78

Se recogió una pequeña parte de la fracción retenida y se secó en horno para determinar el % de sólidos en una base de peso en seco; el resto se secó por pulverización.

Tabla 18

Análisis aproximado (secado por pulverización)					
Descripción de la muestra	Vol seco (ml)	% de sólidos	% de proteína (bps)	% de aceite (bps)*	Fitato
(Secado en horno)	25	5,05	93,7 de media	ND	ND
Entrada en fracción retenida de UF (secado por pulverización)	---	---	93,2	0,24	1,18

Pureza proteica (comparación): se tomó la corriente de carga líquida de la corriente de producción en proceso. El mismo material procesado en la planta produjo una pureza del 79,1 % (bps); mientras que el material procesado en el laboratorio produjo una pureza de > 90 % (93,2).

Perfil de aminoácidos (comparación): la siguiente comparación de aminoácidos solubles del producto final se normaliza con respecto al 100 % de los aa. El perfil es esencialmente invariable con respecto al del material de partida.

TABLA 19

PERFIL DE AMINOÁCIDOS:			
	Producción	Filtración en membrana – Laboratorio (secado por pulverización)	Intervalo (basado en el valor de producción)
aa con azufre	2,85	3,93	2-3
aa aromático	5,43	6,41	5-6
BCAA	11,71	14,36	11-12
AAS	1,09	1,01	1-2
Perfil de aminoácidos – 18 primarios [g de aa/100 g de proteína]			
Ácido aspártico	9,92	9,59	9-10
Ácido glutámico	18,66	20,54	18-20
Serina	5,39	5,27	5-6
Glicina	5,81	5,84	5-6
Histidina	3,38	3,01	3-4
Arginina	7,44	7,64	7-8
Treonina	4,93	4,23	4-5
Alanina	4,75	4,81	4-5
Prolina	5,35	5,93	5-6
Tirosina	3,76	3,41	3-4
Valina	5,11	4,84	5-6
Metionina	2,33	2,28	2-3
Cistina	1,64	2,01	1-2
Isoleucina	3,96	3,69	3-5
Leucina	7,24	7,16	7-8
Fenilalanina	3,80	3,60	3-4
Lisina	5,22	4,84	5-6
Triptófano	1,35	1,31	1-2
Aminoácidos totales	100,00	100,00	

Observaciones visuales

La Figura 3 es una fotografía que compara la imagen visual del polvo procesado en el laboratorio/secado por pulverización en comparación con dos lotes previos de proteína producida de manera continua. El producto secado por pulverización de laboratorio tiene un color claramente más claro con una consistencia más pulverulenta.

Basándose en los datos obtenidos de las evaluaciones del filtro Millipore descritas anteriormente, se encontró que el filtro de 0,65 μ m era el mejor en generar un caudal alto y permitir la permeación de las proteínas a través del filtro mientras retenía el aceite en el lado de carga del sistema. Además, se concluyó que el uso de la microfiltración Millipore mejora la pureza de la proteína alcanzable como se observa comparando el material secado por pulverización de este experimento al 93,2 % (bps) con la pureza del material generado en la planta a solo el 79,6 %

de proteína. Sin embargo, basándose en estos datos, se usará un filtro de 0,4-0,8 μ m, dependiendo del rendimiento real en uso, en el proceso continuo. Se adjunta como la Figura 4 A y B, que representan un diagrama de flujo de un solo proceso, un diagrama esquemático que muestra las diversas etapas de separación de la torta prensada de canola en las partes insoluble y soluble para producir

- 5 a) un aislado que comprende una alta concentración de proteínas de canola solubles;
b) una fase soluble no proteica que comprende principalmente azúcares, y una harina húmeda que comprende partículas insolubles, siendo dichas partículas insolubles proteínas primariamente insolubles.

- 10 Las condiciones de funcionamiento expuestas en las Figuras 4A y B se seleccionaron basándose en las diversas evaluaciones expuestas anteriormente. El material de carga era una semilla de canola triturada con aproximadamente el 14 % de aceite preparada mediante el proceso de prensado en frío descrito anteriormente. Para mostrar el beneficio de la microfiltración, se proyecta que el producto de la ultrafiltración y del secado por pulverización, con y sin microfiltración, basado en datos previos, es como se enumera en la Tabla 20. MF1 se proporciona como un filtro para la corriente de líquido desde el desgrasador. MF2 se proporciona para filtrar y recuperar la proteína soluble del agua de lavado usada para limpiar las superficies internas del equipo de procesamiento y los recipientes. La Tabla 21 proporciona una comparación de la distribución del peso molecular del producto secado por pulverización seco, con y sin MF, y la concentración real de proteína soluble y de aceite residual medida en una base libre de humedad. El IDP es esencialmente igual al de la torta prensada mostrada en la
- 15 Tabla 2. Debe observarse que la eliminación de la humedad residual del producto secado por pulverización proporciona una concentración de proteína de al menos el 93 %.
- 20

TABLA 20

PROPIEDADES PROYECTADAS DE LOS AISLADOS				
	SIN MF		CON MF	
FRACCIÓN RETENIDA POR UF	Fibra/Celulosa	2,00 %	Fibra/Celulosa	0,00 %
	Proteína soluble	12,00 %	Proteína soluble	11,00 %
	Proteína insoluble	2,00 %	Proteína insoluble	0,00 %
	Hidratos de carbono solubles	0,90 %	Hidratos de carbono solubles	0,90 %
	Cenizas	0,40 %	Cenizas	0,04 %
	Aceite	0,40 %	Aceite	0,00 %
	Agua	82,6 %	Agua	87,6 %
SECADO POR PULVERIZACIÓN (INCLUYE HUMEDAD)	Fibra/Celulosa	10,7 %	Fibra/Celulosa	0,0 %
	Proteína soluble	64,2 %	Proteína soluble	86,7 %
	Proteína insoluble	10,7 %	Proteína insoluble	0,0 %
	Hidratos de carbono solubles	4,8 %	Hidratos de carbono solubles	6,8 %
	Cenizas	2,1 %	Cenizas	0,3 %
	Aceite	2,1 %	Aceite	0,0 %
	Agua	5,3 %	Agua	6,1 %

TABLA 21

PRODUCTO SECADO POR PULVERIZACIÓN

Masa molecular [kDa]	(no MF)	(MF)	Intervalo (basado en la MF)
300	26 %	26 %	25-30
300-50	5 %	6 %	5-10
50-30	4 %	5 %	2-7
30-10	15 %	20 %	15-25
10-5	25 %	22 %	15-25
<5	23 %	18 %	15-25
Pureza de proteínas (bps)	79 %	93 %	
Aceite	4 %	0,24 %	

En una realización, por tanto, hay un aislado de proteína que comprende:

- 30 (i) una primera parte de proteínas que tienen un peso molecular superior a aproximadamente 300 kDa, en el que la primera parte representa entre el 25 y el 30 % de la proteína total;
(i) una segunda parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 30 y 10 kDa, en el que la segunda parte representa entre el 15 y el 25 % de la proteína total;
(i) una tercera parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 10 y 5 kDa, en el que la tercera parte representa entre el 15 y el 25 % de la proteína total.
- 35 (i) una cuarta parte de proteínas que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kDa, en el que la cuarta parte representa entre el 15 y el 25 % de la proteína total;

Ejemplo 6

El siguiente ejemplo es un proceso general para los productos proteicos producidos en el Ejemplo 7-10.

- 5 Se prensó la semilla de canola en frío para lograr niveles de aceite del aprox. 12 % en la harina, pero conservando la solubilidad nativa de la proteína (IDP → 30) como resultado de no usar temperaturas elevadas. Se añadió harina de canola (850 kg) a agua (7.000 l) a 50 ± 5 °C bajo buena agitación. Se ajustó el pH a $5 \pm 0,2$ con ácido cítrico de calidad alimentaria (o cualquier otro ácido de calidad alimentaria). Se añadió fitasa de calidad alimentaria (1,2 % v/p (harina)) y Validasa (0,1 % p/p (harina)) y se mezcló la suspensión durante 1-2 horas. A continuación, se ajustó el
- 10 pH a 7 con hidróxido de sodio (o cualquier otra base de calidad alimentaria). Tras el ajuste del pH, se añadió opcionalmente más agua para conseguir el nivel de sólidos deseado (v/v). En este caso, se trató el 30 % de los sólidos (v/v) mediante la adición de 2.400 l de agua. Se repitió el proceso anteriormente mencionado para generar un volumen deseado de suspensión.
- 15 Se retiraron los sólidos de la fase líquida usando una centrífuga de decantación continua a aproximadamente 3.000 g y dos centrífugas continuas de discos, en serie (8300 g y >10.000 g, respectivamente). A continuación, se procesó el líquido clarificado (es decir, retirado de los sólidos) a través de una tercera centrífuga continua de discos (>6000 g) diseñada para eliminar el aceite de la fase acuosa. La temperatura de procesamiento a través de la centrífuga de decantación se mantiene por debajo de 20 °C. La temperatura de procesamiento a través de toda la pila de discos se mantuvo por encima de 50 °C.
- 20

La fase acuosa clarificada y desgrasada se trató entonces mediante HTST (pasteurización a corto tiempo a temperatura elevada) (72-74 °C) para el control microbiológico y la seguridad, y luego se procesó a través de un proceso continuo de ultrafiltración/diafiltración, que separa los azúcares, las cenizas y las impurezas de las proteínas y concentra las proteínas. La solución de proteína concentrada resultante se seca por pulverización.

25

Estudios de las semillas

- 30 En una realización, los procesos de la presente divulgación son útiles para procesar las semillas de canola, y la harina de canola, las semillas de colza, semillas de mostaza, semillas de brócoli, semillas de lino, semillas de algodón, semillas de cáñamo, semillas de cártamo, semillas de sésamo y harina de soja se pueden procesar de la misma manera para proporcionar productos finales de alto contenido de proteínas.
- 35 En una realización de la divulgación, la fuente de semillas comprende semillas de canola o harina de canola, por ejemplo, *Brassica juncea* o *Brassica napus*.

Ejemplo 7

- 40 *B. napus* se evaluó como fuente de semillas. La semilla de *napus* tiene niveles ligeramente superiores de proteína (21-24 %) en comparación con *juncea*, y un IDP significativamente mayor (25-30 de *juncea* frente a 35-40 de *napus*). *napus* se procesó de acuerdo con la presente divulgación y se encontró que tenía el siguiente perfil de aminoácidos mostrado en la Tabla 22:

Tabla 22

	Serie 1	Serie 2	Serie 3	Serie 4	Intervalo
Ácido aspártico	7	6,88	6,66	6,67	6-7
Ácido glutámico	16,4	17,3	18,4	18,6	16-19
Serina	3,86	4,07	3,92	3,79	3-5
Glicina	4,02	4,23	4,18	4,12	4-5
Histidina	2,39	2,73	2,84	2,65	2-3
Arginina	5,72	5,94	6,09	5,97	5-7
Treonina	3,51	4,06	3,57	3,34	3-5
Alanina	3,57	3,69	3,60	3,54	3-4
Prolina	4,92	5,4	5,60	5,60	4-6
Tirosina	2,31	2,39	2,36	2,32	2-3
Valina	3,88	3,98	3,89	4,00	3-4
Metionina	1,73	2,03	1,88	1,88	1-3
Cistina	1,98	2,42	2,58	2,70	1-3
Isoleucina	3,18	3,14	3,12	3,57	3-4
Leucina	5,82	5,89	5,77	6,41	5-7
Fenilalanina	3,49	3,43	3,30	3,22	3-4

Lisina	4,8	5,46	5,27	5,48	4-6
Triptófano	1,08	1,12	1,14	1,20	1-2
Aminoácidos totales	79,7	84,2	84,2	85,1	

Además, los 4 lotes de *napus* ensayados resultaron tener <2 % de aceite (ST).

Ejemplo 8

5

Se examinó el efecto de la dilución de la harina de semillas con agua, con un intervalo de 1:5 a 1:14, para determinar su influencia global sobre el rendimiento y la pureza del producto. El aumento de la relación de dilución tiene la consecuencia de requerir más agua, lo que también reduce la cantidad de sólidos que salen de la ultrafiltración. La ultrafiltración funciona sobre el principio del volumen y la reducción del volumen, y el aumento de sólidos en la UF se muestra como una reducción del flujo a lo largo del tiempo.

10

A una dilución de 1:10 de disolvente acuoso con respecto a la harina de semilla oleaginosa, se obtuvo el siguiente perfil de aminoácidos del producto de proteína que se muestra en la Tabla 23: Tabla 23

	Serie 1	Intervalo
Ácido aspártico	6,93	6-7
Ácido glutámico	19	18-20
Serina	4,33	4-5
Glicina	4,33	4-5
Histidina	2,96	2-3
Arginina	6,16	6-7
Treonina	3,65	3-4
Alanina	3,72	3-4
Prolina	6,02	6-7
Tirosina	2,32	2-3
Valina	4,17	4-5
Metionina	1,97	1-2
Cistina	2,58	2-3
Isoleucina	3,41	3-4
Leucina	6,31	6-7
Fenilalanina	3,6	3-4
Lisina	5,37	5-6
Triptófano	1,22	1-2
Aminoácidos totales	88,1	

15 Una vez que la harina de semilla oleaginosa se mezcló con el disolvente acuoso y, opcionalmente, se mezcló con fitasa y se ajustó el pH, la mezcla se procesó en una centrífuga de decantación. La centrífuga de decantación no se vio afectada por la relación de dilución usada. A velocidad más baja (de aproximadamente 50 litros por minuto) hubo aproximadamente un 4 % de sólidos en la fracción resultante, que aumenta hasta el 5 % a medida que aumenta la velocidad 110 lpm (todo a <20 °C).

20

A continuación, se transfirió la fracción resultante de la centrífuga de decantación a dos centrífugas de discos (en serie). Ambas pilas de discos (Pila de discos 1 (PD1)-Alpha Laval Brew 2000, Pila de discos 2 (PD2)-Westphalia CSA160) se vieron afectadas mínimamente por el cambio en la dilución. Las centrífugas se operaron a velocidades ligeramente más lentas para permanecer en la especificación (PD1 <1,5 %, PD2 <0,2 %). PD1 se pudo aumentar hasta 90 lpm en cuyo punto comenzó a eyectar más sólidos que la especificación. Por consiguiente, PD2 tuvo que ser ralentizada, porque estaba sobrecargada. Mantenerse por debajo del 1,5 % de sólidos en PD1 permite alcanzar < 0,2 % de sólidos en PD2.

25

30 A continuación, se sometió la fracción resultante obtenida de las centrífugas de discos a una centrífuga de extracción de aceite. El desgrasador (Westfalia MSE500) no se vio afectado por el cambio en la relación de dilución. No hubo indicadores de rendimiento que no cumplieran con las especificaciones. El desgrasador se operó a 300 lpm con una descarga del 2,5-3 %. El rechazo del lado del aceite era emulsión de aceite al 40-60 %, en general, promediando por debajo del 50 %.

Después de la centrifuga de desgrasado, se sometió entonces la fracción resultante a ultrafiltración. Se sometió la fracción resultante a ultrafiltración durante 6 horas, en donde la lectura brix en la fracción retenida de UF subió a 26 - normalmente el nivel brix en la UF sería de 19-21 - lo que indica un aumento del % de sólidos, como se esperaba. El cambio en la dilución (aproximadamente el 20 %) aumentó el brix máximo observado por una cantidad similar, como era de esperar. P_{máx} se alcanzó tras 4 horas de tiempo de procesamiento. P_{máx} generalmente ocurre 5-7 horas después de comenzar la producción. De nuevo, como era de esperar, esto proporciona más pruebas de los mayores niveles de sólidos en la fracción resultante y, por consiguiente, el proceso global se ajusta de manera sencilla para tener en cuenta el aumento de sólidos. Además, debido a la dilución reducida, la cantidad de solución por procesar disminuyó en consecuencia, lo que contribuyó a no tener que poner la UF en reciclaje ni detener la producción en ningún punto.

El ajuste del nivel de dilución no afectó al secado por pulverización. La densidad aparente del producto secado por pulverización fue de 0,273. El *napus* ha retornado densidades aparentes de 0,193-0,263: las densidades aparentes variarán basándose en los sólidos de la carga. En términos generales, *napus* ofrece, como media, mayores densidades aparentes que *juncea* (> 0,2). La densidad para este ejemplo fue de 0,39, que nuevamente es ligeramente superior a los lotes diluidos (0,36-0,37) y superior a *juncea* (normalmente < 0,3).

Estudios de la temperatura

En una realización, la temperatura de cualquiera de las fases (es decir, fase líquida, fase sólida) producida durante los procesos de la presente divulgación se ajusta en cualquier punto durante el proceso. Por ejemplo, en una realización, se calienta la fase líquida (tras la separación de la suspensión) hasta una temperatura de entre 30 °C y 70 °C, o de entre 40 °C y 60 °C, o aproximadamente 50 °C, antes de someterla a una separación del líquido (tal como en la pila de discos y/o proceso de centrifugación de desnatado). En otra realización, la temperatura de la suspensión sometida a la separación (por ejemplo, centrifuga de decantación) es superior a 0 °C, pero inferior a 20 °C, o de entre 10 °C y 20 °C, o de aproximadamente 20 °C.

Ejemplo 9

Se instaló un intercambiador de calor antes de la pila de discos 1 (PD1-Alafa Laval Brew 2000). Este intercambiador de calor (una placa y un bastidor) usaba agua como medio de calentamiento y pudo aumentar la temperatura de la solución del proceso de aproximadamente 13 °C (como se recibió de la centrifuga de decantación) a aproximadamente 50 °C antes de cargar el producto en las centrifugas de discos. La proporción de dilución de partida del disolvente acuoso con respecto a la harina fue de 12,5:1 (p/p). El siguiente perfil de aminoácidos del producto proteico se obtuvo como se muestra en la Tabla 24.

Tabla 24

	Serie 1	Intervalo
Ácido aspártico	6,83	6-7
Ácido glutámico	19,2	18-20
Serina	4,11	4-5
Glicina	4,2	4-5
Histidina	2,83	2-3
Arginina	6	5-7
Treonina	3,4	3-4
Alanina	3,64	3-4
Prolina	5,72	6-7
Tirosina	2,32	2-3
Valina	4,2	4-5
Metionina	1,97	1-2
Cistina	2,6	2-3
Isoleucina	3,32	3-4
Leucina	6,17	6-7
Fenilalanina	3,51	3-4
Lisina	5,5	5-6
Triptófano	1,31	1-2
Aminoácidos totales	86,8	

La centrifuga de decantación procesó la solución a 16-18 °C. La absorción de sólidos fue del 3-5 % (media del 4 %) a 60-100 lpm. Además, la velocidad de la centrifuga de decantación se aumentó a 100 lpm durante un periodo de tiempo para ensayar el arrastre de los sólidos, que todavía generó 5 % un arrastre de los sólidos insolubles del 5 %.

Al cambiar la temperatura a medida que la fase líquida entraba en la PD1, se observó una disminución de los sólidos insolubles del 4 al 5 % a aprox. El 2 % en la carga a la PD1. Esto indica una compactación dependiente de la temperatura de los sólidos insolubles.

Al principio, la PD1 se inició a 120 lpm con una tasa de descarga de 3 min. Tanto la velocidad como la sincronización entre las descargas se aumentaron de forma incremental. La velocidad de carga se aumentó hasta un máximo de 170-180 lpm, en la que se alcanzaron 0,5-0,8 % de sólidos insolubles: a velocidades inferiores (≤ 140 lpm), los sólidos insolubles cayeron hasta el 0,1 %. Esto indica que la PD1 alcanza niveles bajos de sólidos. De manera simultánea al aumento en las velocidades de carga, se cambió el intervalo de descarga de 3 min a 5 min. La PD1 produjo descargas (insolubles) que tenían viscosidades más altas, en comparación con una solución de proceso ligeramente cargada (consistencia similar al agua). En general, hubo un aumento del 50 % al 80 % en la capacidad a través de la PD1 con un aumento sustancial en el rendimiento prospectivo (mayor caudal y cantidad reducida de descargas).

Del mismo modo, la PD2 también pudo ejecutarse mucho más rápido con intervalos más largos entre las descargas. Hasta 170 lpm (aprox. 50 °C), la PD2 proporcionó < 0,2 % de sólidos insolubles. El intervalo de descargas se aumentó a 8 min sin degradación de la calidad del producto.

La fracción resultante de la centrifuga de decantación tenía aprox. 4 % de sólidos, mientras que la carga de la PD1 era de la mitad (aprox. 2 %). El cambio en el nivel de sólidos entre la centrifuga de decantación se atribuye a la compactación de los sólidos debido al calentamiento en el intercambiador de calor antes de la entrada a la centrifuga de discos. Además, se mejoró la claridad de la solución calentando la solución hasta > 50 °C antes de la centrifugación.

El aumento de la temperatura de la solución a la centrifuga de desgrasado no dio lugar a cambios sustanciales. En términos generales, hubo un sesgo hacia la emulsión de aceite en el producto defectuoso del lado del aceite. Los niveles eran del 30 al 70 %, pero los valores medios fueron muy superiores al 50 % de emulsión de aceite en las reducciones de centrifugación,

Durante la ultrafiltración (durante aproximadamente 9 horas), el nivel de brix subió hasta 26, pero, en general, estuvo entre 20 y 22. La P_{máx} se consiguió aproximadamente 5 horas después de comenzar la serie.

No hubo cambios sustanciales durante el proceso de secado por pulverización.

Ejemplo 10

Después se examinó el aumento de la temperatura del proceso total. Se obtuvo el siguiente perfil de aminoácidos del producto proteico que se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25

	Serie 1	Intervalo
Ácido aspártico	6,99	6-7
Ácido glutámico	17,9	18-20
Serina	4,15	4-5
Glicina	4,23	4-5
Histidina	2,7	2-3
Arginina	6,02	6-7
Treonina	3,5	3-4
Alanina	3,61	3-7
Prolina	5,57	6-7
Tirosina	2,37	2-3
Valina	4,11	4-5
Metionina	1,88	1-2
Cistina	2,34	2-3
Isoleucina	3,36	3-4
Leucina	6,16	6-7
Fenilalanina	3,59	3-4
Lisina	4,83	5-6
Triptófano	1,19	1-2
Aminoácidos totales	84,5	

En el transcurso de esta serie, las centrifugas de decantación se operaron a 80-100 lpm a aproximadamente 50 °C, siendo la velocidad media de 90 lpm. Los sólidos de la fracción resultante variaron entre 2-4,5 %, siendo el nivel medio de sólidos de la fracción resultante (para ambas máquinas) del 3,5 %. La variación de los sólidos en la fracción resultante a tan bajo como el 2 % no se debió a la mejora de la eficacia, sino que, lo más probablemente, se debió a las variaciones en los sólidos de la carga: junto con el bajo resultado observado, los sólidos de la carga cayeron hasta el 25 %, indicando una tasa de eficiencia del 90 %. Esta tasa de eficiencia no es materialmente diferente de la tasa de eficiencia observada cuando los decantadores se ejecutaron a una carga a <20 °C. En términos generales, el funcionamiento de la centrifuga de decantación no se ve afectado materialmente por la temperatura de funcionamiento.

Las dos centrifugas de discos en serie funcionaron como se esperaba. La PD1 (aproximadamente 190 lpm) produjo aproximadamente un 1 % de sólidos mientras que la PD2 (aproximadamente 155 lpm) redujo la corriente del proceso hasta < 0,2 % de sólidos (normalmente 0,1 %-traza). Las tasas de descarga fueron de 5 y 8 minutos, respectivamente.

No se observó compactación de los sólidos entre el intercambiador de calor y la PD2, porque ya se había alcanzado la temperatura de compactación cuando se hizo pasar la corriente de proceso a través de la centrifuga de decantación.

Durante la centrifugación de desgrasado, las reducciones de centrifugación de la fase de proteína no mostraron aceite y la centrifugación de la fase de aceite mostró emulsión de aceite al 29-50 %.

El aumento de la temperatura del proceso no afectó al proceso de secado por pulverización.

La Tabla 26 ilustra la información de procesamiento de los Ejemplos 7-9:

Tabla 26

	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10
Dilución (agua con respecto a harina)	10:1	12,5:1	12,5:1
Condiciones de procesamiento	Normales (en frío)	En frío en la centrifugación de decantación (normal) y en caliente a través de las centrifugaciones de discos	En caliente a través de la decantación y de las centrifugaciones de discos
Proteína	92,7 % bps [88,3 % tal cual]	96,6 % bps [91,7 % tal cual]	89,7 % bps [85,5 % tal cual]
Aceite (tubo sueco)	1,32 %	0,73 %	2,21 %
% de sólidos de la fracción resultante del decantador (v/v)	4-5 % (18-19 °C)	3-5 % (16-18 °C)	2-4,5 % [3,5 % de media] (aprox. 50 °C)
Velocidad de procesamiento en el decantador	80-100 lpm [90 de media]	60-100 lpm	80-100 lpm [90 de media]
% de sólidos en la carga de PD1 (v/v)	4-5 %	2 % (calentamiento de 13 °C a aprox. 50 °C)	2-4,5 % [3,5 % de media] (aprox. 50 °C)
% de sólidos de la fracción resultante de PD1 (v/v)	< 1,5 %	0,5-0,8 %	1 %
Velocidad de procesamiento de PD1	90-100 lpm	170-180 lpm	190 lpm
% de sólidos de la fracción resultante de PD2 (v/v)	< 0,2 %	< 0,2 %	0,1 % - traza
Velocidad de procesamiento de PD2	90-100 lpm	170 lpm	155 lpm

Como se muestra en la Tabla 26, la eficiencia de decantación permanece en gran medida invariable por la temperatura. La compactación de sólidos se produce cuando la solución del proceso se calienta después de la decantación a una temperatura < 20 °C a aproximadamente 50 °C o superior. La compactación de sólidos permite una mayor eliminación de sólidos insolubles a través de las centrifugas de discos, lo que permite que las pilas de discos funcionen más rápido y se descarguen con menor frecuencia. Las centrifugas de discos funcionan de manera más eficaz a mayor temperatura, ya que se puede obtener un más rendimiento y mayor producción cuando las pilas de discos se ejecutan a una temperatura superior.

Con respecto a la centrifuga de extracción de aceite, la cantidad de aceite presente en el producto proteico es menor cuando la solución del proceso se calienta yendo a la centrifuga de discos. Esto puede deberse a varias posibilidades: 1) mayor eliminación del aceite a través del desgrasador a temperatura elevada; o 2) mayor eliminación del aceite debido a la mejor eliminación de sólidos insolubles a temperatura elevada (mejor claridad de la solución, se sabe que los sólidos insolubles portan una cantidad significativa de aceite-véase la Tabla 27, específicamente datos para la "capa sólida menos densa").

Tabla 27

Capa	% de proteína (bps)	% de aceite (bps)*
Sobrenadante (capa líquida)	44	4,7
Capa sólida menos densa	43	15,2
Capa sólida más densa	29	9,3
*Determinado mediante extracción Soxhlet		

- 10 Como era de esperar, la UF alcanzó la $P_{\max}$ antes para el Ejemplo 8 (con mayor cantidad de sólidos cargados en la UF). Esto se debe al aumento de sólidos cargados en la UF como resultado directo de la dilución reducida. Los resultados del flujo para los Ejemplos 8-10 se muestran en la Tabla 28:

Tabla 28

	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10
Dilución (agua con respecto a la harina)	10:1	12,5:1	12,5:1
Condiciones de procesamiento	Normales (en frío)	En frío en la centrifugación de decantación (normal) y en caliente a través de las centrifugaciones de discos	En caliente a través de la decantación y de las centrifugaciones de discos
Tiempo iniciado	1.300	2.220	1.300
Tiempo finalizado	1.900	1.815	0530
Tiempo total de procesamiento (horas)	6	10,3	10
Caudal inicial (m ³ /h)	11,0	12,5	13,0
Caudal final (m ³ /h)	9,55	8,3	10,1
Tiempo hasta $P_{\max}$ (horas)	4	60-100 lpm	80-100 lpm [90 de media]
VCF	20	20	20
Brix	18-26	17-22	17-24

- 15 Los resultados de rendimiento globales para los Ejemplos 6-9 se muestran en la Tabla 29:

Tabla 29

	Ejemplo 7 (Serie 3)	Ejemplo 8	Ejemplo 9	Ejemplo 10
Torta procesada (kg)	17.000	8.500	9.350	10.200
Proteína en polvo obtenida (kg)	1.411	468	792	723
Producción en la torta	8,3 %	5,5 %	8,47 %	7,1 %

- 20 El Ejemplo 9 demuestra un rendimiento global del aproximadamente 8,5 % de proteína purificada. La razón del aumento del rendimiento se debe, en parte, al aumento del caudal y a la disminución de la frecuencia de las "descargas" (descargas de la máquina para eliminar los sólidos acumulados). Estas descargas eliminan la solución del proceso, aproximadamente equivalente al volumen del cuenco, y por lo tanto, la reducción de las descargas produce un mayor rendimiento. Por lo tanto, las pilas de discos se pueden ejecutar más rápido y con intervalos más largos entre las descargas. Esto se debe a una mejor compactación de los sólidos a una temperatura más alta,
- 25 además de una viscosidad y densidad reducidas de la solución del proceso: se supone que la densidad y la viscosidad de la fase de sólidos permanecen invariables al aumentar la temperatura, haciéndolos más pesados con respecto a la fase líquida y, por tanto, más fáciles de separar.
- 30 Entonces, se examinaron los aislados de proteína preparados en los ejemplos anteriores se para determinar sus perfiles de peso molecular, como se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30

Fuente de la semilla	<i>B. juncea</i>	<i>B. juncea</i>	<i>B. napus</i>	<i>B. napus</i>
Masa (kDa)	%			
>300	48	61	54	44
300-50	2	2	2	2
50-30	2	2	2	2
30-10	11	13	30	39
10-5	27	18	7	8
<5	8	2	5	3

El perfil de peso molecular de los aislados de proteína preparados de acuerdo con los procesos de la presente divulgación demuestra que tanto la proteína cruciferina como la proteína napina están presentes en los aislados. En una realización, por lo tanto, hay un aislado de proteína que comprende:

- (i) una primera parte de proteínas que tienen un peso molecular superior a aproximadamente 300 kDa, en el que la primera parte representa entre el 40 y el 65 % de la proteína total;
- (i) una segunda parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 30 y 10 kDa, en el que la segunda parte representa entre el 10 y el 40 % de la proteína total;
- (i) una tercera parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 10 y 5 kDa, en el que la tercera parte representa entre el 5 y el 30 % de la proteína total.

En otra realización, el aislado de proteína comprende:

- (i) una primera parte de proteínas que tienen un peso molecular superior a aproximadamente 300 kDa, en el que la primera parte representa entre el 40 y el 65 % de la proteína total;
- (i) una segunda parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 300 y 50 kDa, en el que la segunda parte representa entre el 0 y el 5 % de la proteína total;
- (i) una tercera parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 50 y 30 kDa, en el que la tercera parte representa entre el 0 y el 5 % de la proteína total.
- (i) una cuarta parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 30 y 10 kDa, en el que la cuarta parte representa entre el 10 y el 40 % de la proteína total;
- (i) una quinta parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 10 y 5 kDa, en el que la quinta parte representa entre el 5 y el 30 % de la proteína total; y
- (i) una sexta parte de proteínas que tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kDa, en el que la sexta parte representa entre el 0 y el 10 % de la proteína total.

Las porciones más pequeñas son artefactos de ensayo. Las proteínas son multiméricas, y una parte de las mismas se separa en 2 fragmentos más pequeños.

Concentrado hidrolizado

La hidrólisis enzimática se realizó anteriormente (solicitudes anteriores de los solicitantes citadas anteriormente) usando un precursor que comprendía harinas de canola desgrasadas que contenían menos del 3 % de aceite (bps) para producir concentrados de proteína hidrolizada. Estos concentrados de proteína hidrolizados anteriores normalmente contenían del 75 al 90 % (bps) de proteína. Se ha descubierto ahora que se pueden producir concentrados de proteínas hidrolizadas de alta calidad a partir de materiales de alto contenido de aceite (harina que contiene > 9 % de aceite (bps) denominada de aquí en adelante "harina oleaginosa") y también denominada comúnmente torta prensada de canola, obtenida presionando la harina para eliminar una parte del aceite, no exponiéndose la harina a la extracción con disolvente. Se encontró que el aceite residual se puede liberar de la harina como parte o después del proceso de hidrólisis. Además, se ha encontrado que la ultrafiltración (UF) posterior eliminaría cualquier aceite liberado de la harina y, por lo tanto, el uso de la harina oleaginosa como entrada al proceso de hidrólisis tiene viabilidad. Inesperadamente, se descubrió que el proceso previamente divulgado de los solicitantes que se realizó sobre harina desgrasada proporcionó un producto igual o mejor cuando una harina oleaginosa era la corriente de carga, y que la variabilidad en las corrientes de carga entrantes no afecta al proceso ni a la calidad del producto final hidrolizado.

Los siguientes Ejemplos 11-13 describen ensayos a escala de laboratorio realizados para evaluar el efecto de varias variables y varias enzimas diferentes sobre la hidrólisis de proteínas insolubles para formar, y luego separar, proteínas y péptidos solubles. La Alcalasa y la Flavourzyme, ejemplos de endopeptidasas y exopeptidasas, son miembros de un gran grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en los enlaces de amida intermedios o terminales de una cadena polipeptídica o molécula de proteína. La Neutrasa y Protamex se clasifican más ampliamente como enzimas proteasa. Para demostrar un escenario de peor caso, el material de carga que entró en el proceso de hidrólisis fue una harina oleaginosa que tenía aproximadamente un 10,5 % de aceite de bps, que es mayor que del 9 al 9,5 % (bps) de aceite que se encuentra normalmente en una torta prensada.

Ejemplo 11 – Procesamiento de harina oleaginosa**Materiales**

- 5 Material de carga – alto nivel de sólidos insolubles en aceite separados y recuperados como producto secundario en el proceso para producir aislados de proteína de *B. juncea*.

Enzima – La Alcalasa 2.4L FG y la Flavourzima 1000L se adquirieron en Novozymes North America, Inc., Franklinton, N.C. EE.UU.

Procedimiento

Se mezclaron aproximadamente 0,4 kg de los sólidos insolubles durante 10 minutos bajo agitación con 1,2 kg de agua destilada y luego se sometieron a centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos, separando los primeros sólidos insolubles lavados de un líquido extraído. A continuación, se mezclaron los primeros sólidos lavados durante 10 minutos bajo agitación, con 1, 2 kg de agua destilada y luego se sometieron a centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos para separar los segundos sólidos lavados (0,38 kg) del líquido extraído.

A continuación, se mezclaron los segundos sólidos lavados con agua destilada a una proporción de sólidos con respecto al agua de 1 a 2,5 en peso. Se ajustó el pH a 8,3 y se ajustó la temperatura a 60 °C bajo agitación. Se añadió a la suspensión un gramo de Alcalasa (dosis del 0,25 % basada en 0,4 kg de sólidos de alto contenido de aceite de partida (harina oleaginosa)) y se mantuvo a 60 °C durante 4 horas para producir la hidrólisis. A continuación, se enfrió la suspensión hasta 50 °C. Se midió el pH en 6,75. Se añadió un gramo de Flavourzima (dosis del 0,25 % basada en 0,4 kg de peso inicial de alto contenido de sólidos en aceite (harina oleaginosa)) y se realizó una hidrólisis adicional a 50 °C durante 4 horas.

Tras la hidrólisis, se centrifugó la suspensión a 4.000 rpm durante 10 minutos para separar la proteína hidrolizada soluble extraída de los sólidos insolubles. Se mezclaron los sólidos insolubles con agua a una proporción de los sólidos con respecto al agua de 1 a 2 en peso, a lo que le siguió una centrifugación para separar la fracción extraída soluble adicional de los sólidos lavados. Se combinaron las proteínas hidrolizadas solubles extraídas entre sí, y se obtuvieron aproximadamente 1,6 kg de las proteínas hidrolizadas combinadas extraídas. Se filtraron las proteínas hidrolizadas solubles extraídas combinadas a través de una membrana de UF de corte de peso molecular de 10.000 Da. Se analizó la fracción permeada (proteína hidrolizada extraída filtrada) se analizó para determinar el contenido de proteínas y sólidos.

Resultados y discusión

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 31:

Tabla 31

Análisis del material inicial e intermedio, y proteína hidrolizada y sólidos extraídos resultantes					
Muestra	Humedad 80,50	Proteína (% bps)	Cenizas (% bps)	Aceite (% bps)	Fibra en bruto (% bps)
Sólidos insolubles (material de carga)	99,02	32,8	5,62	10,5	15,3
Fracción extraída de proteína hidrolizada combinada	99,02	79,6	-	-	-
Fracción extraída de proteína hidrolizada filtrada a través de membrana	99,52	88,2	5,06	0,02	0,06
Sólidos de la fibra de la hidrólisis de la proteína	87,5	14,6	5,2	10,7	23,9

La proteína hidrolizada extraída antes de la filtración por membrana contiene el 80 % de proteína en una base de peso en seco. El rendimiento de recuperación de proteínas es del 49 %, que se calcula como la cantidad de proteínas de la fracción extraída de proteínas hidrolizadas dividida entre la cantidad de proteínas de los sólidos de partida. Las proteínas hidrolizadas extraídas filtradas a través de membrana contienen un 88 % de proteína en una base de peso en seco. Estos resultados son comparables a los del concentrado proteico hidrolizado de harina de canola desgrasada de las solicitudes de referencia mencionadas anteriormente. Dicho ensayo también muestra que la pureza es mejorada (antes de la UF del 80 %, después de la UF del 88 %) mediante el proceso de UF que retira las partículas finas y la materia oleaginosa.

Mientras que el material sólido de alto contenido de aceite de partida contenía el 10,5 % de aceite, después de la filtración por membrana, las proteínas hidrolizadas extraídas filtradas contenían el 0,02 % de aceite. Por lo tanto, se

demostró que es posible producir el concentrado proteico hidrolizado que contenía alto nivel de proteínas y poco contenido de aceite a partir de harina de alto contenido de aceite usando el proceso desarrollado para harina desgrasada.

5 Ejemplo 12 - Evaluación de la dosis de enzima

Se expusieron alícuotas de los segundos sólidos lavados a diferentes concentraciones de enzimas, tiempo de hidrólisis y combinaciones de enzimas para evaluar el efecto sobre el rendimiento de la recuperación de proteínas, la pureza y la distribución del peso molecular. Se mezclaron muestras de los segundos sólidos lavados con agua destilada para preparar una suspensión con aproximadamente un 8 % de sólidos, se ajustó el pH de la suspensión a 8,3 y se calentó la suspensión hasta 60 °C bajo agitación. Se añadió Alcalasa a una dosis basada en el peso en seco del sustrato. Se realizó la hidrólisis a 60 °C. Tras la hidrólisis de las proteínas, se centrifugó la suspensión a 4.000 rpm durante 10 minutos para separar las proteínas hidrolizadas solubles extraídas de los sólidos húmedos. Se mezclaron los sólidos húmedos con agua destilada en una proporción de 1 a 2,5 en peso, a lo que le siguió una centrifugación a 4.000 rpm durante 10 minutos para separar más proteínas hidrolizadas solubles extraídas adicionales de los sólidos agotados. Se combinaron las proteínas hidrolizadas solubles extraídas, y se determinaron el peso, los sólidos y el contenido de proteínas.

Alcalasa – La dosis de Alcalasa fue del 0,75 % o del 1,5 % basada en el peso en seco de los sólidos.

Combinación de Alcalasa y Flavourzima: Se enfrió la suspensión hasta 50 °C y se añadió Flavourzima a una dosis basada en el peso en seco del sustrato (peso seco de los segundos sólidos lavados) a la suspensión y se realizó una hidrólisis adicional a 50 °C durante 4 horas.

Combinación de Alcalasa y Neutrasa: Se enfrió la suspensión hasta 50 °C y se ajustó el pH hasta 6,5. Se añadió Neutrasa a una dosis basada en el peso en seco del sustrato (peso seco de los segundos sólidos lavados) a la suspensión y se realizó una hidrólisis adicional a 50 °C durante 4 horas.

Combinación de Alcalasa y Protamex: Se enfrió la suspensión hasta 40 °C y se ajustó el pH hasta 6,0. Se añadió Protamex a una dosis basada en el peso en seco del sustrato (peso seco de los segundos sólidos lavados) a la suspensión y se realizó una hidrólisis adicional a 40 °C durante 4 horas.

Resultados y discusión

En la Tabla 32, se muestran los resultados del efecto de la enzima y de la combinación de enzimas sobre el rendimiento de recuperación de proteínas y la pureza de las proteínas hidrolizadas extraídas. Se trata de ejemplos representativos de enzimas, combinaciones de enzimas, concentraciones y tiempos de tratamiento. Un experto en la materia reconocerá que se pueden usar enzimas alternativas, y que se puede variar el tiempo y la concentración para variar el grado de hidrólisis y la composición de aminoácidos y péptidos del producto final, así como la distribución del peso molecular en ese producto final. En una realización, el proceso produce un concentrado proteico hidrolizado que tiene un contenido proteico (aminoácidos, péptidos y proteínas) superior al 65 % bps, o superior al 70 % bps, o de entre el 65 % y el 75 % bps.

Tabla 32. Efecto de la enzima y de la combinación de enzimas sobre el rendimiento de recuperación de proteínas y la pureza de las proteínas hidrolizadas extraídas

Enzimas y combinaciones de enzimas	Duración de la hidrólisis (horas)	Contenido de proteína de la fracción extraída hidrolizada (% bps)	Rendimiento de recuperación de proteína (%)
Alcalasa al 0,75 %	2	75,2	47,1
Alcalasa al 0,75 %	3	73,7	49,0
Alcalasa al 0,75 %	4	74,8	50,5
Alcalasa al 0,75 %	8	74,2	59,8
Alcalasa al 1,5 %	2	76,7	49,1
Alcalasa al 1,5 %	3	75,4	53,2
Alcalasa al 1,5 %	4	74,5	54,0
Alcalasa al 1,5 %	8	74,0	61,6
Alcalasa al 0,75 % y Flavourzima al 0,2 %	4 para cada enzima	74,5	61,2
Alcalasa al 0,75 % y Flavourzima al 0,4 %	4 para cada enzima	72,2	59,0
Alcalasa al 0,75 % y Flavourzima al 0,75 %	4 para cada enzima	71,7	59,4

Alcalasa al 1,5 % y Flavourzima al 0,2 %	4 para cada enzima	71,2	60,1
Alcalasa al 1,5 % y Flavourzima al 0,4 %	4 para cada enzima	74,7	64,8
Alcalasa al 1,5 % y Flavourzima al 0,75 %	4 para cada enzima	74,3	65,3
Alcalasa al 1,5 % y Flavourzima al 1,5 %	4 para cada enzima	72,9	62,2
Alcalasa al 0,75 % y Neutrasa al 0,2 %	4 para cada enzima	74,5	63,8
Alcalasa al 0,75 % y Neutrasa al 0,4 %	4 para cada enzima	74,9	63,4
Alcalasa al 1,5 % y Neutrasa al 0,2 %	4 para cada enzima	75,9	66,4
Alcalasa al 1,5 % y Neutrasa al 0,4 %	4 para cada enzima	74,9	67,0
Alcalasa al 0,75 % y Protamex al 0,2 %	4 para cada enzima	76,0	57,2
Alcalasa al 0,75 % y Protamex al 0,4 %	4 para cada enzima	73,8	61,0
Alcalasa al 1,5 % y Protamex al 0,2 %	4 para cada enzima	70,3	63,2
Alcalasa al 1,5 % y Protamex al 0,4 %	4 para cada enzima	69,6	61,1

El rendimiento de recuperación de proteína se calcula como las proteínas totales de la fracción extraída de proteínas hidrolizadas solubles divididas entre las proteínas totales de los sólidos lavados de partida. Usando Alcalasa al 0,75 %, el aumento del tiempo de hidrólisis de 2 a 8 horas potencia el rendimiento de recuperación de proteína del 47,1 % al 59,8 %. Del mismo modo, la Alcalasa al 1,5 %, y un aumento en el tiempo de hidrólisis de 2 a 8 horas potencia el rendimiento de recuperación de proteína del 49,1 % al 61,6 %. Sin embargo, el aumento en la dosis de Alcalasa del 0,75 % al 1,5 % solo mejoró marginalmente el rendimiento de recuperación de proteína; el tiempo de hidrólisis tuvo un mayor impacto en el rendimiento que la concentración.

Al 0,75 % de Alcalasa, no se encontró que el uso adicional de Flavourzima a una dosis del 0,2 al 0,75 % mejorara el rendimiento de recuperación de proteína, y un aumento en las cantidades de Alcalasa, Flavourzima a dosis del 0,2 al 1,5 % solo mejoró el rendimiento de recuperación de proteína ligeramente. Por otro lado, su uso mejoró el sabor y redujo la amargura de las proteínas hidrolizadas extraídas.

En contraste con la Flavourzima, el uso de Neutrasa a dosis del 0,2 al 0,4 % tras el uso de Alcalasa al 0,75 % aumenta el rendimiento de recuperación de proteína hasta del 62,2 al 63,8 %. El rendimiento de recuperación de proteína aumentó aún más hasta del 66,4 al 67,0 % tras el uso de Alcalasa al 1,5 %. De este modo, la Neutrasa mejora el rendimiento de recuperación de proteína en un 4-9 % frente a la Alcalasa sola, dependiendo de la dosis de Alcalasa.

El uso de Protamex a una dosis del 0,2-0,4 % tras el uso de Alcalasa bien al 0,75 o al 1,5 % no mejora el rendimiento de recuperación de proteína. El rendimiento de recuperación de proteína cambió del 59,8 % con Protamex al 0 % y 8 horas de tiempo de hidrólisis hasta del 57,2 al 61,0 %. Sin embargo, ayudó a reducir la proporción de proteínas hidrolizadas en el intervalo de más de 0,6 kDa y aumentó la proporción de dímero.

Se encontró que la pureza de las proteínas hidrolizadas extraídas, representada por su contenido proteico, resultó ser similar para la Alcalasa a diversas dosis y tiempos de hidrólisis, así como para diversas combinaciones de enzimas y cayó dentro del intervalo del 70 al 77 % (Tabla 32). La combinación de Alcalasa al 1,5 % y de Protamex al 0,2-0,4 % produce una pureza ligeramente inferior. Sin embargo, la pureza se puede mejorar hasta > 80 % mediante el uso posterior de la UF.

En la Tabla 33, se muestra el efecto de las enzimas y de las combinaciones de enzimas sobre la distribución del peso molecular de las proteínas hidrolizadas extraídas. Debido a que las proteínas hidrolizadas en forma de péptidos y aminoácidos tienen pesos moleculares mayormente inferiores a 5 kDa, pasan a través de una membrana de 10 kDa que se usa para retirar simultáneamente el aceite y producir una fracción extraída clara. Las proteínas hidrolizadas existen principalmente en forma de dímeros y de monómeros.

Aunque la Flavourzima no mejora significativamente el rendimiento de recuperación de proteínas, reduce la proporción de peso molecular en el intervalo de 0,6-3 kDa y aumenta la proporción de monómero y de triptófano libre con respecto al uso de Alcalasa sola. La Flavourzima como una segunda enzima ayuda a reducir la proporción de proteínas hidrolizadas en el intervalo por encima de 0,6 kDa, aumenta la proporción de dímero a una dosis baja del 0,2 % y eleva el nivel de triptófano libre. Por otra parte, una dosis más alta de Flavourzima aumenta la proporción de monómero.

La Neutrasa también reduce la proporción de peso molecular en el intervalo de 0,6-3 kDa y aumenta la proporción de dímero. La Neutrasa como una segunda enzima aumentó el rendimiento de recuperación de proteína, pero no mejoró la pureza de las proteínas hidrolizadas extraídas. Esta enzima no libera triptófano.

Basándose en los resultados del rendimiento de recuperación de proteínas, la pureza de las proteínas hidrolizadas extraídas y la distribución del peso molecular de las proteínas hidrolizadas, las combinaciones de enzimas Alcalasa al 1,5 % y Flavourzima al 0,2 %, y Alcalasa al 1,5 % y Neutrasa al 0,2 % parecerían ser las combinaciones preferidas.

Tabla 33. Efecto de la dosis de enzima y de la combinación sobre la distribución del peso molecular de las proteínas hidrolizadas extraídas

Combinación de enzimas	Enzima 1	Enzima 2	Peso molecular (kDa)						Triptófano (g*100 g ⁻¹)
			> 10	10-5	3-5	0,6-3	Dímero	Monómero	
Alcalasa al 0,75 % Flavourzima al 0,2 %	Alcalasa al 0,75 %	Flavourzima al 0,2 %	<1	0	2	18	42	33	0,27
Alcalasa al 0,75 %, Flavourzima al 0,4 %	Alcalasa al 0,75 %	Flavourzima al 0,4 %	<1	0	2	12	43	38	0,39
Alcalasa al 0,75 %, Flavourzima al 0,75 %	Alcalasa al 0,75 %	Flavourzima al 0,75 %	<1	0	2	17	37	38	0,47
Alcalasa al 0,75 %, Neutrasa al 0,2 %	Alcalasa al 0,75 %	Neutrasa al 0,2 %	<1	0	2	14	47	33	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, Neutrasa al 0,4 %	Alcalasa al 0,75 %	Neutrasa al 0,4 %	<1	0	2	14	51	31	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, Protamex al 0,2 %	Alcalasa al 0,75 %	Protamex al 0,2 %	<1	0	2	15	51	31	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, Protamex al 0,4 %	Alcalasa al 0,75 %	Protamex al 0,4 %	<1	0	2	13	51	31	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, Alcalasa al 0,75 %	Alcalasa al 0,75 %	Alcalasa al 0,75 %	2	0	2	14	46	33	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, Flavourzima al 0,2 %	Alcalasa al 1,5 %	Flavourzima al 0,2 %	1	0	2	11	54	29	0,27
Alcalasa al 1,5 %, Flavourzima al 0,4 %	Alcalasa al 1,5 %	Flavourzima al 0,4 %	1	0	2	10	45	39	0,39

Alcalasa al 1,5 %, Flavourzima al 0,75 %	Alcalasa al 1,5 %	Flavourzima al 0,75 %	1	0	2	8	42	44	0,49
Alcalasa al 1,5 %, Flavourzima al 1,5 %	Alcalasa al 1,5 %	Flavourzima al 1,5 %	1	0	2	6	40	55	0,6
Alcalasa al 1,5 %, Neutrasa al 0,2 %	Alcalasa al 1,5 %	Neutrasa al 0,2 %	<1	0	2	11	48	34	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, Neutrasa al 0,4 %	Alcalasa al 1,5 %	Neutrasa al 0,4 %	<1	0	2	11	48	34	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, 2 h	Alcalasa al 0,75 %	2 horas	1	0	4	20	44	28	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, 3 h	Alcalasa al 0,75 %	3 horas	1	0	4	20	44	28	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, 4 h	Alcalasa al 0,75 %	4 horas	<1	0	4	20	44	30	<0,1
Alcalasa al 0,75 %, 8 h	Alcalasa al 0,75 %	8 horas	<1	0	3	18	45	31	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, 2 h	Alcalasa al 1,5 %	2 horas	1	0	4	20	44	28	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, 3 h	Alcalasa al 1,5 %	3 horas	<1	0	3	18	44	33	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, 4 h	Alcalasa al 1,5 %	4 horas	<1	0	3	19	45	39	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, 8 h	Alcalasa al 1,5 %	8 horas	<1	0	3	18	48	28	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, Protamex al 0,2 %	Alcalasa al 1,5 %	Protamex al 0,2 %	<1	0	2	14	48	35	<0,1
Alcalasa al 1,5 %, Protamex al 0,4 %	Alcalasa al 1,5 %	Protamex al 0,4 %	<1	0	2	14	48	35	<0,1

En una realización, las proteínas hidrolizadas extraídas comprenden:

- i) una primera parte de monómeros de proteínas hidrolizadas, en las que la primera parte representa entre el 25 y el 45 % de la proteína total;
- ii) una segunda parte de dímeros de proteínas hidrolizadas, en las que la segunda parte representa entre el 35 y el 55 % de la proteína total; y
- iii) una tercera parte de proteína hidrolizada que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 3 y 0,6 kDa, en las que la tercera parte representa entre el 5 y el 20 % de la proteína total.

Ejemplo 13 - Evaluación la ultrafiltración para retirar el aceite

Este ejemplo demuestra la utilidad de la ultrafiltración (UF) para retirar el aceite presente en la corriente del proceso de hidrólisis donde el material de carga es una harina triturada en frío que contiene del 9 al 14 % de aceite.

Se mezcló la harina oleaginosa con agua en una proporción de 1:7 para formar una suspensión, se ajustó el pH de la suspensión a 7 con hidróxido de sodio y luego se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos para separar los sólidos insolubles de la fase acuosa. Los sólidos insolubles se recogieron y se lavaron de nuevo en la misma proporción de 1:7 dos veces más.

A continuación, se mezclaron los sólidos insolubles húmedos con agua para proporcionar una suspensión que contenía 10 % de sólidos, se calentó la suspensión a 60 °C y se ajustó el pH a 8,3. A continuación, se añadió Alcalasa a la suspensión a una dosis del 1 % basada en el peso seco del material de partida. Se dejó digerir la suspensión con agitación durante 4 horas. Después de 4 horas, se redujo la temperatura hasta 50 °C y se añadió Flavourzima a una dosis del 1 % basada en el peso en seco del material de partida. Se digirió la suspensión durante otras 4 horas con agitación.

Se calentó la suspensión hidrolizada, que tenía un pH de 6,85, hasta 30 °C y se dividió en 2 fracciones. Se ajustó una a pH 7 con hidróxido sódico y la otra se ajustó a pH 4 con ácido clorhídrico para determinar si la modificación del pH causaría un cambio en la cantidad de material graso que pasaba a través de las membranas alterando el estado de ionización del material saponificado. Se centrifugó la suspensión de pH 7 a 4.000 rpm durante 10 minutos para separar la fracción de sólidos de la fracción líquida. Se lavaron los sólidos con 2 veces el volumen en agua. Se combinó el líquido de la primera separación con el lavado de la segunda separación. Se siguió el mismo proceso para la suspensión de pH 4.

Se filtraron los líquidos de la fracción extraída de pH 7 a través de UF Millipore (membrana de 10 kDa de PM), y se recogieron las fracciones permeada y recogida, y se secaron en horno para el análisis posterior del aceite. Se repitió la ultrafiltración con la fracción extraída del procedimiento a pH 4 de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Se secaron las muestras líquidas en el horno a 90 °C durante la noche y se analizó el contenido de aceite para determinar la eficacia de UF en la extracción del aceite.

Tabla 34

Muestra	% de aceite (bps)
Harina oleaginosa lavada, previa a la hidrólisis [Ensayo en el peor de los casos]	13
Harina después de la hidrólisis [Ensayo en el peor de los casos]	17
Sobrenadante (carga de UF) [Ensayo en el peor de los casos]	1
Fracción permeada de UF (carga a pH 7)	0,0
Fracción permeada de UF (carga a pH 4)	0,12

Se libera solo una fracción del aceite presente de la harina oleaginosa durante la hidrólisis. Por lo tanto, se suministró solo una pequeña cantidad de aceite a la UF para su retirada (<2 %). La Tabla 34 muestra que el contenido de aceite en la fracción permeada es del 0 al 0,12 % de aceite (bps) tras la ultrafiltración. El proceso UF es, por tanto, capaz de retirar las pequeñas cantidades de materia oleaginosa liberada en la corriente del proceso y de proporcionar niveles muy bajos de aceite. En comparación con los resultados del proceso de hidrólisis realizado en harina desgrasada, los niveles de aceite en el producto final son equivalentes.

Basándose en los datos obtenidos de esta evaluación, se encontró que la membrana de UF (PM de 10 kDa) era eficaz en la retirada del aceite de la fracción extraída hidrolizada independientemente del pH del material de carga. El aceite potencialmente saponificado fue retenido por la membrana de UF.

La proteína hidrolizada previamente desarrollada puede tener un sabor fuerte con un alto amargor y color oscuro. Estas propiedades pueden limitar sus aplicaciones. Por consiguiente, la selección de un sistema enzimático o una operación unitaria adicional que pueda modificar el sabor y el color para que sea más apropiado para aplicaciones de alto uso, tales como la nutrición deportiva, sería ventajosa. A la luz de los resultados obtenidos en las evaluaciones de laboratorio expuestas en los Ejemplos 11-13 anteriores, se realizó un proceso a escala piloto, mayor, de preparación de un concentrado hidrolizado preferido, como se describe a continuación.

Ejemplo 14: Producción piloto de concentrado hidrolizado

Se prepararon cinco lotes, como se describe a continuación. Un lote se dividió en 2 lotes secundarios. El material de carga era una harina de canola de *B. napus* o *B. juncea* parcialmente desgrasada tras el prensado en frío y tenía un contenido de aceite ≥ 12 %.

1) Se trató *B. juncea* con Alcalasa (0,5 %)/Flavourzima (0,13-0,14 %).

2) Se trató *B. juncea* con Alcalasa (1,5 %)/Flavourzima (0,4 %).

3) Se trató un lote mayor (70 % superior) a los lotes 1 o 2 de material de carga de *B. juncea* con Alcalasa (1,5 %)/Neutrassa (0,2 %) y después se dividió en dos sublotos tras la ultrafiltración.

a. se procesó el sub lote a) mediante nanofiltración tras la ultrafiltración

b. Se trató el sub lote b) con tratamiento con carbono tras la ultrafiltración y después se sometió a nanofiltración.

4) *B. napus*: sobrecalentado antes de la ultrafiltración, se trató con Alcalasa (1,5 %)/Neutrassa (0,2 %) y después se sometió a tratamiento con carbono antes de la ultrafiltración.

5) Se trató *B. napus* con Alcalasa (1,5 %)/Neutrassa (0,2 %).

Preextracción de material de *napus* y *juncea*:

Se proporcionó *B. napus* como una harina de torta prensada, parcialmente desgrasada, seca. Se proporcionó *B. juncea* como una harina húmeda tras la separación de las proteínas solubles para la preparación del aislado mediante el proceso descrito anteriormente (véase las Fig. 4A-4B). Se ajustó el pH a $5 \pm 0,2$ (usando ácido cítrico para el ajuste del pH) antes de la introducción de la fitasa. Se añadió fitasa al 1,2 % basada en los sólidos secos. A continuación, se lavó la harina tratada con fitasa y se centrifugó dos veces dando lugar a una harina húmeda con aproximadamente del 20 al 22 % de sólidos, siendo el resto agua y aceite. A continuación, se mezcló la harina húmeda con agua de OI para proporcionar una suspensión de ~8 % de sólidos. La suspensión se ajustó después a $60 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH $8,3 \pm 0,2$.

Se añadió Alcalasa a una velocidad del 0,5 % (lote 1) y del 1,5 % (lotes 2-5) del peso seco de los sólidos. Por ejemplo, para un contenido de sólidos de 200 kg, se añadieron 3 kg de Alcalasa en el lote 2. La enzima se agitó con la harina durante 4 horas. Después del tratamiento con Alcalasa, la suspensión se enfrió a $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para los lotes 1 y 2, se añadió Flavourzima al 0,13 % (lote 1) o al 0,4 % (lote 2) del peso en seco de los sólidos (el mismo peso en seco usado para la adición de la Alcalasa). Por ejemplo, para el lote 2, se añadieron 0,8 kg de Flavourzima para 200 kg de sólidos secos. El tratamiento con Flavourzima fue durante 4 horas más. Para los lotes 3, 4 y 5, se añadió Neutrassa al 0,2 %, basada en el mismo peso en seco de sólidos, y luego se mantuvo durante 4 horas.

Recuperación de fracción hidrolizada:

Después del tratamiento enzimático, se centrifugó la suspensión tratada usando una centrífuga de decantación Westfalia y una centrífuga de disco para separar las proteínas hidrolizadas extraídas de los sólidos insolubles. La fracción extraída tenía sólidos insolubles de $< 0,1 \text{ } \%$ v/v. Se lavaron los sólidos adicionalmente mezclándolos con agua de OI en una proporción de 1 con respecto a 2 en peso y se volvieron a centrifugar para separar cualquier proteína hidrolizada soluble adicional de los sólidos lavados. La separación por centrifugación a 1100-1400 l/h dio sólidos sedimentables al 0,1 %.

Se recogió la fracción extraída de las dos decantaciones de recuperación de producto (denominado fracción extraída desechada) y se ajustó a pH 7 usando ácido cítrico. La temperatura de la suspensión y de los extractos se mantuvo a $55\text{-}60 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación, se pasteurizó la fracción extraída a una temperatura de $72\text{-}74 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 20 segundos.

Ultrafiltración:

Para permitir que solo se recuperara el material de bajo peso molecular y se excluyeran los materiales de alto peso molecular y de aceite, se sometió la fracción extraída desechada a ultrafiltración. Aunque la solución de partida (fracción extraída desechada) era turbia y opaca, la fracción permeada de ultrafiltración resultó ser coloreada, pero transparente. Los parámetros de ultrafiltración (UF) fueron: presión de entrada de 379,2-413,7 kPa (55-60 psi), presión de salida de 68,9-103,4 kPa (10-15 psi), temperatura $55\text{-}60 \text{ }^{\circ}\text{C}$, membranas de corte de PM DE 10.000.

Se sometió el material a ultrafiltración hasta un 90-95 % del volumen original y se recogió la fracción permeada. Una vez que se redujo el volumen, se añadió una cantidad igual de agua de OI y se impregnó hasta el nivel concentrado original (diafiltración (DF)). Se repitió de nuevo el procedimiento y se combinaron las fracciones permeadas de DF.

Tratamiento con carbono

Se dividió el lote 3 en dos partes. Se expuso la parte a) a nanofiltración mientras que la parte b) se ajustó a pH 6 y luego se mezcló con carbono y un coadyuvante de filtración. A continuación, se retiraron los sólidos usando un prensador de filtro de placa y bastidor dotado de un coadyuvante de filtración. El carbono añadido fue de un 25 % del contenido de sólidos en la solución. Se mezcló la solución que contenía carbono durante 30 minutos antes de la adición del coadyuvante de filtración al 50 % del contenido de sólidos.

En el lote 4, se sometió la solución a tratamiento con carbono tras comprobar que se había calentado por encima de $92 \text{ }^{\circ}\text{C}$ antes de la ultrafiltración. Esto usó proporciones de contacto de carbono al 25 % y de adyuvante de filtración del 100 % basándose en los sólidos entrantes.

Nanofiltración

Se sometió la fracción permeada de la etapa de ultrafiltración a nanofiltración para retirar el exceso de agua y sales, y aumentar la concentración de sólidos antes del secado por pulverización. Los parámetros de la nanofiltración (UF) eran una presión de entrada de 1723,9 kPa (250 psi) (la presión de salida era 1516,84-1599,58 kPa [220-232 psi] a una temperatura de 30 °C. Se pasteurizó la fracción retenida de NF (la proteína hidrolizada extraída) a una temperatura de 72-74 °C durante aproximadamente 20 segundos.

Secado por pulverización

Se cargó la fracción extraída de proteínas hidrolizadas concentrada, después de la nanofiltración (a temperatura ambiente) en un secador por pulverización que tenía una temperatura del aire de entrada de 170 ± 5 °C. Se ajustó la temperatura del aire de salida a 80 ± 5 °C para obtener un producto secado por pulverización con un contenido de humedad del 6 ± 1 %.

Resultados y discusión

Resultados generales de la producción del producto hidrolizado:

En las Tablas 35 y 36, se muestra la comparación de las diversas propiedades de los productos producidos en las cinco series mencionadas anteriormente.

Tabla 35: Análisis de productos del tratamiento de hidrólisis

N.º de ensayo	1	2	3a	3b	5
Tipo de semilla	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>napus</i>
Análisis fisicoquímico					
Proteína (N x 6,25) "tal cual"	91,6 %	85,5 %	87,5 %	88,8 %	76,9 %
Proteína (N x 6,25) "bps"	94,6 %	89,4 %	90,3 %	91,9 %	79,2 %
Humedad y sustancias volátiles (% tal cual)	3,18	4,39	3,06	3,39	2,87
Solubilidad (como % de CP)	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9
Solubilidad (% de proteína soluble en bruto tal cual)	91,5	85,4	87,4	88,7	76,8
Hidratos de carbono (% de bps por diferencia)	-0,04	3,58	0,41	3,88	7,09
Grasa (% de bps, tubo sueco)	0,4	0,0	0,0	0,0	0,2
Grasa (% de bps por hidrólisis ácida)	0,24	0,34	0,24	0,19	0,32
Cenizas (%)	4,8	6,5	9,0	3,9	12,9
Fibra (% de AOCS Ba 6-84)	0,06	0,03	0,03	0,03	0,04
Glucosinolatos totales (µmol/g)	0,06	< DL	0,06	0,05	0,06
Fitatos totales (% de ácido fítico)	0,42	0,46	0,50	0,50	0,98
Minerales totales (g/ 100 g)	3,34	3,16	4,23	3,63	5,59

Se encontró que la ultrafiltración resultó ser muy eficaz para excluir el aceite transportado de la harina inicial de su incorporación en el producto final. Esta operación unitaria también garantizó que la proteína hidrolizada del producto final fuera completamente soluble.

Tabla 36: Propiedades organolépticas y rendimiento de los productos hidrolizados

N.º de ensayo	1	2	3a	3b	5
Tipo de semilla	juncea	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>napus</i>
Análisis organoléptico					
Inspección visual	Castaño	Castaño amarillento	Castaño	Blanquecino	Amarillo
Sabor	Caldoso moderado de amargor medio	Amargor más fuerte y caldoso	Menos amargo, más como el Cheddar rancio	Más suave que 3a	Sabor de amargor más fuerte
Color del polvo seco (Hunter L)	78,67	75,04	79,06	84,96	76,52
Color de la solución al 1 %	67,63	66,15	68,58	76,41	60,57
Color de la solución al 5 %	36,93	31,61	41,13	62,73	25,95
Rendimiento del producto					
Proteína de la harina lavada (kg/1.000 kg de harina húmeda inicial)	57	60	56,5	56,5	32,4
Proteína extraída (kg/1.000 kg de harina húmeda inicial)	34	33,5	40,3	40,3	17
Eficiencia de la extracción por hidrólisis (% de proteína total)	53 %65 %	56 %65 %	67 %65 %	67 %65 %	50 %65 %
Sólidos secos a través de ultrafiltración/1.000 kg de harina húmeda	35,5	31,1	39,1	35,6	19,5
Paso de proteína de ultrafiltración [basado en el 100 % del paso de la fracción extraída]	100 %	73 %±8 %	88 %	88 %	90 %
Rendimiento mecánico (nanofiltración y secado por pulverización)	67 %	78 %	79 %	79 %	76 %

La extracción con Flavourzima fue altamente eficaz tanto para la dosis baja como para los sistemas de dosis alta, con una extracción proteica del 53 % y 57 %, respectivamente. La Neutrasa dio lugar a una extracción más alta, del 67 % de la proteína total de la harina. Cuando se usa la harina de la semilla de *napus*, la baja proteína residual se traduce en una menor proteína disponible, así como una menor eficacia relativa de la extracción enzimática de solo el 50 %, presumiblemente debido a las altas cantidades de materiales de alto peso molecular.

La ultrafiltración del sistema de Flavourzima de dosis baja (0,14 %) dio lugar a una recuperación del 100 % de las proteínas. Los niveles más altos de hidrólisis condujeron a recuperaciones más bajas, del aproximadamente 90 % para el sistema de la Neutrasa y del aproximadamente 73 %/68 % para el sistema de Flavourzima de dosis alta (0,4 %).

El sistema de Alcalasa/Flavourzima de baja dosis de enzima (Lote 1) dio como resultado una excelente pureza de proteínas con una solubilidad equivalente. Como se muestra en la Tabla 36, el sabor fue bastante bueno. El menor uso de enzima proporciona un grado inferior de hidrólisis y, como tal, puede tener una respuesta inmunogénica potencialmente más fuerte. La Flavourzima de dosis baja del lote 1 produjo una mejor recuperación general y pureza proteica. El sistema enzimático bajo también mejoró el color del producto tanto en forma de polvo seco como de solución.

El uso del sistema enzimático de Neutrasa generó un producto más ligero tanto seco como en solución, y cuando se acopló con tratamiento con carbono, el producto se mejoró aún más. El producto de Neutrasa tratado con carbono era de un color blanquecino claro, y cuando se preparó como una solución al 5 % resultó ser de un color paja claro en comparación con el color del té oscuro resultante de los otros hidrolizados. Se presentan otros resultados del tratamiento con carbono se con respecto a las Figuras 5 y 6, y las siguientes Tablas 37-39. El hidrolizado derivado de *napus* resultó ser esencialmente más oscuro que el resto de las otras series, tanto en seco como húmedo, como se muestra por los bajos números de Hunter L anteriores, siendo decididamente más amarillo.

Los productos proteicos tenían niveles de minerales razonables para la proteína hidrolizada con niveles de sodio del 1,5 % al 2,5 % para todos los lotes de *juncea* y niveles de calcio aceptables. Como se muestra en la Tabla 37, existe una fuerte correlación entre el contenido total de minerales, especialmente de sodio, y los niveles de fitato. El uso del tratamiento con carbono condujo a aumentos en el cloruro (el ácido usado para disminuir el pH fue el HCl de calidad alimentaria) y el fósforo, así como el aluminio y el cadmio. Esto se debe probablemente a los metales del material de adyuvante de la filtración. El contenido de azufre se debió al alto nivel de aminoácidos que contienen azufre en la proteína.

Tabla 37: Contenido de minerales de cada producto hidrolizado

N.º de ensayo	1	2	3a	3b	5
Tipo de semilla	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>napus</i>
Minerales Informes de SRC*** (ug/g)					
Cloruro (hidrosoluble)	< 120	< 120	< 50	2.060	370
Aluminio	< 0,5	< 0,5	< 0,5	2,9	< 0,5
Arsénico	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,12	< 0,05
Cadmio	0,03	0,02	0,02	0,05	0,02
Calcio	1.220	420	560	730	440
Cromo	< 0,5	< 0,5	0,7	3,2	< 0,5
Cobalto	0,04	0,06	0,06	0,08	0,03
Cobre	17	11	22	13	4,0
Yodo	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Hierro	11	13	14	40	8,3
Plomo	0,02	<0,01	0,03	0,05	< 0,01
Magnesio	1.220	690	650	740	1.100
Manganeso	2,7	1,3	1,4	3,1	2,7
Molibdeno	1,1	1,9	2,2	4,4	0,9
Mercurio	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Fósforo	2.120	1.550	1.760	4.630	3.330
Potasio	2.130	1.730	1.440	880	5.690
Selenio	4,8	5,5	5,1	5,2	5,4
Sodio	14.600				
Azufre	12.100	11.800	12.600	12.400	12.400
Cinc	16	22	12	5,5	9,1
Minerales totales g/100 g	3,34 %	3,16 %	4,23 %	3,63 %	5,59 %
Metales pesados totales (As, Pb, Hg, Cd) ug/g	0,105	0,085	0,105	0,225	0,04

Uno de los principales fines para el desarrollo de la proteína hidrolizada es recuperar el valor máximo de la semilla mediante la producción de proteínas solubles (o péptidos) adecuados para fines nutricionales. Cada uno de los lotes descritos anteriormente dio como resultado perfiles proteicos altamente nutritivos con puntuaciones de aminoácidos de -1,24 para los sistemas de Flavourzima y de 1,13-1,18 para el sistema de Neutrasa.

Tabla 38. Perfil de aminoácidos de los productos hidrolizados

N.º de ensayo	1	2	3a	3b	5	Intervalo
Tipo de semilla	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>napus</i>	
Perfil de aminoácidos (g/100 g de producto tal cual)						
Ácido aspártico	7,32	6,29	6,42	6,67	6,09	6-8
Ácido glutámico	18,1	17,1	18,2	20	15,9	15-20
Serina	3,91	2,48	4,55	4,84	4,3	3-5
Glicina	4,71	4,46	4,64	4,86	4,09	4-5
Histidina	3,45	3,63	3,5	3,47	2,55	2-4
Arginina	5,10	2,14	5,1	4,63	3,49	3-6

Treonina	3,60	3,15	3,62	3,74	3,36	3-4
Alanina	3,99	3,86	4,08	4,49	3,71	3-5
Prolina	5,52	5,52	5,5	5,29	5,43	5-6
Tirosina	3,16	2,20	2,96	2,78	2,97	2-4
Valina	4,87	5,01	4,27	4,51	4,22	4-6
Metionina	2,06	2,03	2,12	2,32	2,03	2-3
Cistina	2,12	2,17	2,29	2,21	2,16	2-3
Isoleucina	4,12	4,30	3,62	3,74	3,13	3-5
Leucina	7,07	7,09	6,82	7,27	5,96	6-8
Fenilalanina	3,98	4,07	3,75	3,72	3,43	3-5
Lisina	5,31	4,92	4,76	5,05	4,42	4-6
Triptófano	1,37	1,47	1,39	0,96	1,08	1-2
Aminoácidos totales	89,7	81,9	87,6	90,6	78,3	75-95
Material no aminoacídico	10,3	18,1	12,4	9,4	21,7	
Puntuación de aminoácidos	1,233	1,252	1,132	1,161	1,176	

Tabla 39: Perfil de calidad de los aminoácidos

N.º de ensayo	Patrón recomendado por la FAO de la OMS para 3-10 años de edad†	1	2	3a	3b	5	Intervalo
Tipo de semilla		<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>napus</i>	Intervalo
Perfil de aminoácidos (g/100 g de producto tal cual)							
Ácido aspártico		8,2 %	7,7 %	7,3 %	7,4 %	7,8 %	7-9
Ácido glutámico		20,0 %	20,9 %	20,8 %	22,1 %	20,3 %	20-23
Serina		4,4 %	3,0 %	5,2 %	5,3 %	5,5 %	3-6
Glicina		5,3 %	5,4 %	5,3 %	5,4 %	5,2 %	5-6
Histidina	1,6 %	3,8 %	4,4 %	4,0 %	3,8 %	3,3 %	3-5
Arginina		5,7 %	2,6 %	5,8 %	5,1 %	4,5 %	2-6
Treonina	2,5 %	4,0 %	3,8 %	4,1 %	4,1 %	4,3 %	3-5
Alanina		4,4 %	4,7 %	4,7 %	5,0 %	4,7 %	3-4
Prolina		6,2 %	6,7 %	6,3 %	5,8 %	6,9 %	5-7
Tirosina	(4,1 %*)	3,5 %	2,7 %	3,4 %	3,1 %	3,8 %	2-4
Valina	4 %	5,4 %	6,1 %	4,9 %	5,0 %	5,4 %	4-7
Metionina	1,2 %	2,3 %	2,5 %	2,4 %	2,6 %	2,6 %	2-3
Cistina	1,2 %	2,4 %	2,6 %	2,6 %	2,4 %	2,8 %	2-3
Isoleucina	3,1 %	4,6 %	5,3 %	4,1 %	4,1 %	4,0 %	4-6
Leucina	6,1 %	7,9 %	8,7 %	7,8 %	8,0 %	7,6 %	7-9
Fenilalanina	(4,1 %*)	4,4 %	5,0 %	4,3 %	4,1 %	4,4 %	4-6
Lisina	4,8 %	5,9 %	6,0 %	5,4 %	5,6 %	5,6 %	5-7
Triptófano	0,66 %	1,5 %	1,8 %	1,6 %	1,1 %	1,4 %	1-2

Aminoácidos totales		100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	
Proporción de material no aminoácido/aminoácidos		11,5 %	22,1 %	14,2 %	10,4 %	27,7 %	
*Recomendación de 4,1 g de aminoácidos aromáticos combinados/100 g de proteína							
†Patrón de proteínas recomendado según la FAO de la OMS para 3-10 años de edad, 2007 (Serie 935 del informe técnico de la OMS)							

Se redujo el triptófano total con el tratamiento con carbono cuando la Neutrasa era la enzima secundaria. Esto se debe a la retención del triptófano en el dímero y las moléculas más grandes cuando se usa Neutrasa. Por el contrario, en el pasado, se encontró que la Flavourzima libera triptófano como un aminoácido libre que posteriormente se absorbería durante el tratamiento con carbono. El tratamiento con carbono también dio lugar a la absorción de materiales no aminoácidos/peptídicos y a una mejora en la pureza. Esto también se pone de manifiesto por la eliminación significativa del color que da lugar a una solución de proteína con un color paja pálido en comparación con el marrón claro que se observa en el producto no sometido a tratamiento con carbono.

Como se muestra en la Figura 5, el perfil de aminoácidos no tuvo ningún cambio significativo como resultado del tratamiento con carbono, pero hubo algún cambio como resultado de la absorción específica de péptido y aminoácidos sobre el carbono. El producto proteico resultante seguía estando bien equilibrado con una buena puntuación de aminoácidos. De hecho, el tratamiento con carbono mejoró la puntuación total de aminoácidos en comparación con el lote no tratado.

Suponiendo que no se puede transformar ni generar ningún aminoácido mediante el tratamiento con carbono, es posible estimar el grado mínimo de contracción debido al tratamiento con carbono, incluso si no es evidente a partir del rendimiento del producto acabado. El aminoácido con el mayor aumento relativo en proporción fue la alanina, y suponiendo una retención del 100 %, en la Tabla 40 y la Figura 6, se puede ver que la masa total del producto se contrajo en un 9,2 %. El mayor cambio absoluto fue para la arginina y el material no aminoácido a una pérdida de 0,9 g/100 g y 3,9 g/100 g, mientras que la pérdida relativa más alta fue con el material no aminoácido y el triptófano al 31,1 % y 37 %, respectivamente. Estos cambios sirvieron para mejorar el equilibrio en la calidad de la proteína y purificar aún más la proteína. La pérdida de triptófano fue aceptable cuando se comparó con el valor requerido.

Tabla 40 – Contracción de material aminoácido y no aminoácido a través del tratamiento con carbono

Lote 3	Antes del carbono [g/100 g de partida]	Después del carbono [g/100 g de partida]	Pérdida al carbono [g/100 g de partida]	Pérdida relativa
Ácido aspártico	6,42	6,06	0,359	5,6 %
Ácido glutámico	18,2	18,17	0,026	0,1 %
Serina	4,55	4,40	0,152	3,3 %
Glicina	4,64	4,42	0,224	4,8 %
Histidina	3,5	3,15	0,347	9,9 %
Arginina	5,1	4,21	0,893	17,5 %
Treonina	3,62	3,40	0,222	6,1 %
Alanina	4,08	4,08	0,000	0,0 %
Prolina	5,5	4,81	0,693	12,6 %
Tirosina	2,96	2,53	0,434	14,7 %
Valina	4,27	4,10	0,172	4,0 %
Metionina	2,12	2,11	0,012	0,6 %
Cistina	2,29	2,01	0,282	12,3 %

Isoleucina	3,62	3,40	0,222	6,1 %
Leucina	6,82	6,61	0,214	3,1 %
Fenilalanina	3,75	3,38	0,370	9,9 %
Lisina	4,76	4,59	0,171	3,6 %
Triptófano	1,39	0,87	0,518	37,2 %
Material no aminoacídico total	12,4	8,54	3,858	31,1 %
Producto total (tal cual)	100	90,82	9,167	9,2 %

Efecto sobre la distribución del peso molecular

- 5 Una comparación de los sistemas enzimáticos, véase la Tabla 41, muestra que el sistema de la Neutrasa produjo niveles más bajos de monoaminoácidos, y no produjo ningún triptófano libre en solución, mientras que el sistema enzimático de Alcalasa/Flavourzima de baja dosis de enzima del Lote 1 dio lugar a esencialmente menos aminoácido monomérico que la dosis superior usada en el Lote 2 y aproximadamente un 35 % menos de triptófano libre. El sistema de Neutrasa fue más eficaz para romper las proteínas a pesos moleculares inferiores a 600 Da en las series de *juncea*. Como el organismo tiene mecanismos de transporte de péptidos dímeros y trímeros cortos diferentes a los de los aminoácidos libres debido a que el hígado agota rápidamente los aminoácidos libres en la corriente sanguínea, existe una gran ventaja en limitar el grado de hidrólisis con el fin de aumentar al máximo la retención de péptidos cortos. El bajo contenido de triptófano libre limitó el efecto negativo del tratamiento con carbono en el perfil de aminoácidos, mientras que los estudios de laboratorio en los que se usó el sistema de Flavourzima dieron lugar a una pérdida del 95 % de triptófano cuando se usó Flavourzima a dosis altas (aprox. 15 1,5 % de sólidos secos).

Tabla 41 – Efecto del tratamiento sobre el perfil del peso molecular

N.º de lote	1	2	3a	3b	5
Fuente	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>napus</i>
Combinación de enzimas	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Neutrasa	Alcalasa/Neutrasa	Alcalasa/Neutrasa
Enzima 1 Alcalasa	0,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %
Enzima 2	Flavourzima al 0,14 %	Flavourzima al 0,4 %	Neutrasa al 0,2 %	Neutrasa al 0,2 %	Neutrasa al 0,2 %
Tratamiento con carbono				2,5 % de solución	

Masa molecular (kDa)	>10	0	0	0	0	0
	10-5	0	0	0	0	0
	3-5	0	0	0	0	3
	0,6-3	25	9	9	9	10
	Dímero	37	35	62	63	53
	Monómero	36	47	28	26	52
Triptófano libre (g*100 g ⁻¹)		0,27	0,42	< 0,1	< 0,1	< 0,1

- 20 En una realización, las proteínas hidrolizadas extraídas comprenden:

- 25 i) una primera parte de monómeros de proteínas hidrolizadas, en las que la primera parte representa entre el 25 y el 50 % de la proteína total;
 ii) una segunda parte de dímeros de proteínas hidrolizadas, en las que la segunda parte representa entre el 35 y el 65 % de la proteína total; y
 iii) una tercera parte de proteína hidrolizada que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 3 y 0,6 kDa, en las que la tercera parte representa entre el 5 y el 25 % de la proteína total.
 iv) una cuarta parte de proteína hidrolizada que tiene un peso molecular de entre aproximadamente 3 y 5 kDa, en

las que la cuarta parte representa entre el 0 y el 5 % de la proteína total.

La hidrólisis de la harina de *napus* lavada dio lugar a la presencia de material de alto peso molecular, estando el 3 % de las proteínas en el intervalo de 3 a 5 kDa. Esto indica un menor grado de hidrólisis o menos retención por la membrana de ultrafiltración cuando se compara con ensayos anteriores en la serie de *B. juncea* sin nanofiltración ni ultrafiltración. (Véase la Tabla 42). El procesamiento a través de la membrana elimina el material de más de 3 kDa y cambia esencialmente el perfil de tamaño del péptido tanto para el sistema de Alcalasa/Flavourzima como para los sistemas de Alcalasa/Neutrassa. Para el sistema de Neutrassa, la distribución del peso molecular es muy sesgada hacia el dímero, mientras que el contenido de monoaminoácidos se reduce y el material de alto peso molecular se reduce.

Tabla 42. Cambio en el perfil de peso molecular del laboratorio a la planta piloto

N.º de lote	DATOS DE LABORATORIO	1	DATOS DE LABORATORIO	2	DATOS DE LABORATORIO	3A
Fuente	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>	<i>juncea</i>
Combinación de enzimas	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Neutrassa	Alcalasa/Neutrassa
Enzima 1 Alcalasa	0,75 %	0,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %	1,5 %
Enzima 2	Flavourzima al 0,2 %	Flavourzima al 0,14 %	Flavourzima al 0,4 %	Flavourzima al 0,4 %	Neutrassa al 0,2 %	Neutrassa al 0,2 %
Tratamiento con carbono						
Masa molecular (kDa)	> 10	< 1	0	< 1	0	1
	10-5	0	0	0	0	0
	3-5	2	0	2	0	2
	0,6-3	18	25	10	16	11
	Dímero	42	37	45	35	48
	Monómero	33	36	39	47	34
Triptófano Libre (g*100 g ⁻¹)	0,27	0,27	0,39	0,42	< 0,1	< 0,1

Uno de los aspectos clave de la producción de proteínas hidrolizadas es que la digestión enzimática parcial de las proteínas disminuye la respuesta inmunogénica a la proteína. Esto es importante en aplicaciones especializadas tales como la nutrición médica y pediátrica, en las que el receptor tiene un sistema inmunológico comprometido o inmaduro y puede tener capacidad limitada para comunicarse. Anteriormente, diversas muestras de ensayo de proteína hidrolizada se han dirigido a estos mercados. La mejor muestra anterior recibida fue el producto producido mediante el tratamiento de la harina de canola desgrasada lavada generada a partir del proceso anterior basado en disolvente y posteriormente hidrolizada durante 4 horas con Alcalasa al 1 % y Flavourzima al 1 %. También se prepararon varias muestras usando el Protomex como enzima secundaria o un uso enzimático inferior para efectuar diferentes grados de hidrólisis. Cuando se usó el sistema de Protomex, la respuesta inmunogénica fue mayor que cuando se usó un sistema de Flavourzima con la misma distribución de peso molecular y mismo grado de hidrólisis. Esto sugiere que la Flavourzima es más apropiada para reducir la inmunogenicidad. Los grados inferiores de hidrólisis también condujeron a una mayor respuesta inmunogénica.

La Tabla 43 compara los materiales preparados anteriormente en el Ejemplo 14 con los resultados de una proteína hidrolizada previa preparada a partir de la harina de canola desgrasada lavada. Se descubrió que la Neutrassa era muy eficaz para hidrolizar la proteína insoluble y permitir la extracción. El hidrolizado resultante no tenía triptófano libre, y tenía un perfil de peso molecular superior al material de Flavourzima con respecto a la posible respuesta inmunogénica.

El perfil de peso molecular del Lote 2, (Alcalasa y Flavourzima al 1,5 % y 0,4 %, respectivamente), parece ser una alternativa adecuada al producto de muestra que previamente se mostró y probó por los clientes. La Neutrassa parece lograr un perfil molecular similar, pero esto no significa que disminuya adecuadamente la respuesta de inmunogenicidad debido a la especificidad de los patrones de hidrólisis de proteínas cuando se usa la hidrólisis enzimática.

Tabla 43. Pesos moleculares de la hidrólisis de canola lavada desgrasada frente a la no desgrasada

N.º de lote	0101213-A	101107D	20101213-D	1	2	3
Fuente	Torta prensada de <i>juncea</i> desgrasada	Torta prensada de <i>juncea</i> desgrasada	Torta prensada de <i>juncea</i> desgrasada	Harina de canola lavada de <i>juncea</i> no desgrasada	Harina de canola lavada de <i>juncea</i> no desgrasada	Harina de canola lavada de <i>juncea</i> no desgrasada
Alergenicidad	Baja (título de 1,6)	Producto convencional	Moderada (título de 1,95)			
Combinación de enzimas	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Flavourzima	Alcalasa/Neutrassa
Enzima 1 Alcalasa	1 %	1 %	0,5 %	0,5 %	1,5 %	1,5 %
Enzima 2 (Flavourzima)	1 %	1 %	0,25 5	0,14 5	0,4 %	Neutrassa al 0,2 %
Tratamiento con carbono						
Masa molecular (kDa)	> 10	0	0	0	0	0
	10-5	0	0	1	0	0
	3-5	0	1	2	0	0
	0,6-3	13	10	20	16	9
	Dímero	44	43	44	37	62
	Monómero	42	43	31	47	28
Triptófano Libre (g*100 g ⁻¹)	0,81	0,81	0,4	0,27	0,42	< 0,1

Con respecto a las proteínas y la inmunogenicidad, el material que tiene un peso molecular superior a 3.000 Da, en general, tiene una respuesta inmunogénica más alta y una respuesta relativa de inmunogenicidad de conejo tras 35 días de exposición a una proteína. La proteína debe ser inferior a un título de 1,5 log para calificarla como hipoalergénica. Todas las muestras de los productos de *juncea* descritos en la Tabla 43 cumplen los primeros criterios, pero no se han ensayado en modelos de animales.

En una realización, las proteínas hidrolizadas extraídas comprenden:

- i) una primera parte de monómeros de proteínas hidrolizadas, en las que la primera parte representa entre el 25 y el 50 % de la proteína total;
- ii) una segunda parte de dímeros de proteínas hidrolizadas, en las que la segunda parte representa entre el 35 y el 65 % de la proteína total; y
- iii) una tercera parte de proteína hidrolizada que tienen un peso molecular de entre aproximadamente 3 y 0,6 kDa, en las que la tercera parte representa entre el 5 y el 25 % de la proteína total.

La Alcalasa/Flavourzima es un sistema probado para reducir la respuesta inmunogénica, y crea un producto con una respuesta cuantificada y mejorada. Con fines de modelización, se cree que puede ser necesaria la dosis más alta de Alcalasa y Flavourzima (1,5 % y 0,4 %, respectivamente) para llevar el producto por debajo de la marca de título de 1,5 definida como hipoalergénica. La Neutrassa muestra un gran potencial para lograr también la respuesta inmunogénica baja requerida.

La revisión de los datos de permeación de los dos sistemas enzimáticos diferentes muestra que la ultrafiltración fue más rápida cuando se usó el sistema de Alcalasa/Flavourzima de bajo nivel enzimático del Lote 1. La nanofiltración de la fracción extraída concentró satisfactoriamente la fracción extraída hasta un volumen más apropiado para el secado por pulverización.

En resumen, las evaluaciones con la harina de canola de *juncea* lavada produjeron proteínas hidrolizadas de buena calidad con puntuaciones de aminoácidos de más de 0,13 según el patrón de puntuación recomendado para los niños de 3 a 10 años por la Organización Mundial de la Salud. Además, el uso tanto de la ultrafiltración como de la nanofiltración generó purezas de las proteínas superiores de más del 85 % (Nx6,25) en una base tal cual en comparación con la pureza de las proteínas < 75 % para las series anteriores realizadas con harina de *juncea* desgrasada y lavada sin nanofiltración.

El procesamiento enzimático hidroliza aproximadamente el 60 % de la proteína insoluble de la harina lavada. Esto varió según el sistema de hidrólisis con el sistema de Flavourzima, produciendo un 55 % de extracción de proteína, y el sistema de Neutrassa, con una extracción enzimática del 67 %. Esto se debe a la actividad endopeptidasa de la Neutrassa, que conduce a una mayor escisión de la proteína insoluble en contraste con la Flavourzima, que actúa sobre los extremos de las cadenas de proteínas. El material de carga de *napus* parece tener una menor eficiencia

enzimática, probablemente debido a la menor concentración de proteína en solución y al mayor peso molecular de las proteínas insolubles en el material de partida.

Todas las evaluaciones en las que se usó semilla de *juncea* dieron lugar a que todos los pesos moleculares de la proteína hidrolizada estuvieran por debajo de 3 kDa, que es el intervalo recomendado para los materiales hipoalergénicos. Mientras que el patrón de escisión para la Neutrasa no se ensayó para reducir la respuesta inmunogénica, basándose en el perfil de peso molecular de estos materiales hidrolizados, se cree que cumplen el estándar para los materiales hipoalergénicos. De lo contrario, la combinación enzimática preferida para los productos de baja alergenicidad es el sistema de dosificación de Alcalasa al 1,5 %/Oflavourzima al 0,4 %.

El uso de la harina de *napus* mostró que la mayor capacidad de extracción de proteína de *napus* conduce a una menor recuperación de la proteína por hidrólisis y, por consiguiente, a un mayor material no proteico en el producto hidrolizado. El producto de *napus* final también resultó tener un sabor más fuerte y un color oscuro más intenso. Sin embargo, las series de extracción posteriores han confirmado la mayor capacidad de extracción de la etapa primaria del material de *napus* y un perfil de peso molecular sesgado a tamaños mayores. Si las proteínas residuales de la harina de *napus* son, como media, mayores que las de la harina de *juncea*, cabría esperar que el peso molecular medio, tras un período dado de hidrólisis, fuera mayor.

La reducción de la dosis de Alcalasa y Flavourzima en un 66 % durante la hidrólisis con respecto al nivel preferido anterior dio lugar a una excelente recuperación y una excelente pureza de las proteínas, superior al 90 %. Aunque el grado de hidrólisis se redujo, todavía era muy alto, con un 100 % de la proteína por debajo de los 3 kDa y más del 75 % de dímero o monoaminoácido. La hidrólisis inferior también mejoró el perfil de sabor con respecto al material más altamente hidrolizado. El cambio del sistema enzimático a Alcalasa y Neutrasa dio lugar a un grado muy alto de hidrólisis, monoaminoácidos inferiores, ningún triptófano libre y un perfil de sabor diferente, pero aceptable.

El tratamiento con carbono fue muy beneficioso para eliminar el color del producto hidrolizado y mejorar el perfil de sabor. Mientras que los aminoácidos aromáticos fueron absorbidos en el proceso, el perfil de aminoácidos final se mejoró con respecto al material que no fue sometido a tratamiento con carbono cuando se usó el sistema de hidrólisis de Alcalasa-Neutrasa. El perfil de aminoácidos final se enriqueció en ácido glutámico, lo que, en general, se percibe como un mejor sabor debido al efecto del sabor umami. El mayor cambio en la composición fue la absorción de materiales no aminoácidos y, posteriormente, la pureza final fue superior al 90 %, esencialmente sin nitrógeno no proteico.

La ultrafiltración fue eficaz para excluir el aceite del producto final, pero requiere una limpieza extensiva de las membranas para mantener el caudal a lo largo del proceso de ultrafiltración. La nanofiltración fue muy beneficiosa para concentrar la proteína antes del secado por pulverización y mejorar la pureza de la proteína hidrolizada.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de producción de un aislado de proteína a partir de una harina de canola o de colza que comprende:

- proporcionar una harina de semilla oleaginosa prensada en frío, estando la harina prensada en frío a una temperatura de 85 °C o inferior;
- mezclar la harina de semilla oleaginosa prensada en frío obtenida con agua para formar una suspensión;
- opcionalmente, tratar la suspensión con fitasa a una temperatura y a un pH adecuados para la actividad de la fitasa;
- separar la suspensión con una separación sólido/líquido para formar:
 - una fase líquida que comprende el disolvente acuoso, proteína soluble y aceite; y
 - una fase sólida;
- separar la fase líquida para formar:
 - una fase de aceite; y
 - una fase acuosa de proteína;
- someter la fase acuosa de proteína a filtración de membrana para obtener una solución de proteína; y
- secar la solución de proteína para obtener el aislado de proteína.

2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la separación sólido/líquido de la mezcla se realiza mediante una centrifuga de decantación.

3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la centrifuga de decantación se opera a una fuerza g de entre 2.000 y 4.000 g.

4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que a la centrifugación de decantación le sigue una primera y una segunda centrifugas de discos en serie.

5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la primera centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 6.000 y 9.000 g y la segunda centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 8.000 y 12.000 g.

6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la separación de la fase líquida se realiza mediante centrifugación.

7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la separación de la fase líquida se realiza mediante una centrifuga de desgrasado, una centrifuga de discos, una centrifuga bifásica o una centrifuga trifásica, o una combinación de las mismas.

8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la centrifuga de discos se opera a una fuerza g de entre 2.000 y 10.000 g.

9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el aislado de proteína comprende menos del 2 % (p/p) de aceite.

10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el aislado de proteína tiene una distribución de los aminoácidos como se presenta a continuación:

Aminoácido	g de aa/100 g de proteína
Ácido aspártico	9-10
Ácido glutámico	18-20
Serina	5-6
Glicina	5-6
Histidina	3-4
Arginina	7-8
Treonina	4-5
Alanina	4-5
Prolina	5-6
Tirosina	3-4

Valina	5-6
Metionina	2-3
Cistina	1-2
Isoleucina	3-5
Leucina	7-8
Fenilalanina	3-4
Lisina	5-6
Triptófano	1-2

11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el aislado de proteína tiene una distribución del peso molecular como se presenta a continuación:

Masa molecular (kDa)	Intervalo (basado en la microfiltración)
300	25-30
300-50	5-10
50-30	2-7
30-10	15-25
10-5	15-25
<5	15-25

5

12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el aislado de proteína comprende:

10

- (i) una primera parte de proteínas que tienen un peso molecular superior a 300 kDa, en donde la primera parte representa entre el 40 y el 65 % de la proteína total;
- (ii) una segunda parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre 30 y 10 kDa, en donde la segunda parte representa entre el 10 y el 40 % de la proteína total; y
- (iii) una tercera parte de proteínas que tienen un peso molecular de entre 10 y 5 kDa, en donde la tercera parte representa entre el 5 y el 30 % de la proteína total.

15

13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el aislado de proteína tiene una concentración de proteína soluble de al menos el 90 %.

FIGURA 1

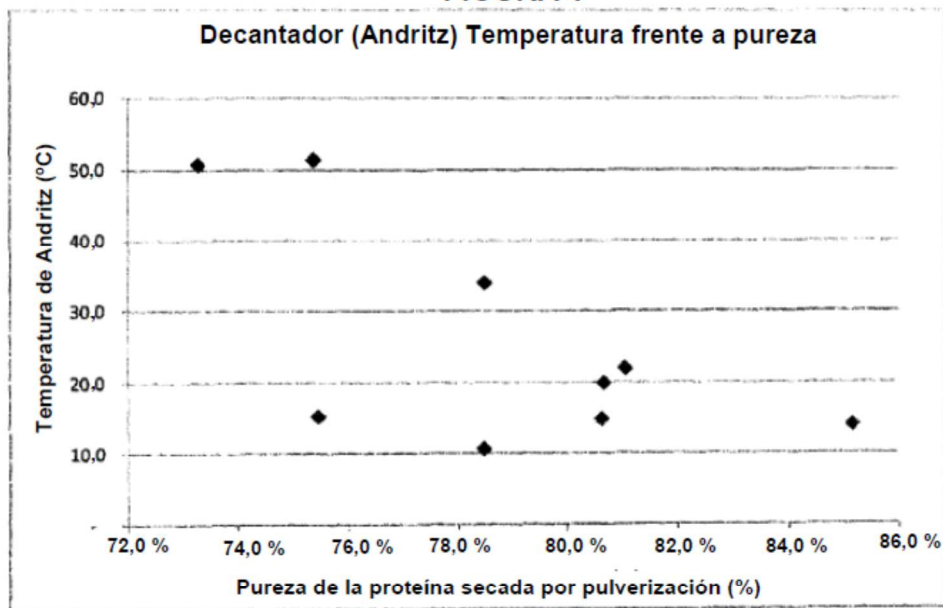
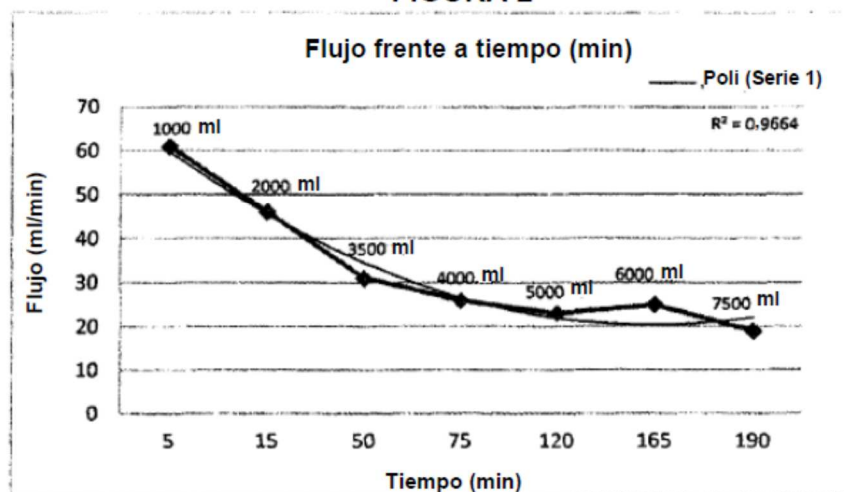


FIGURA 2



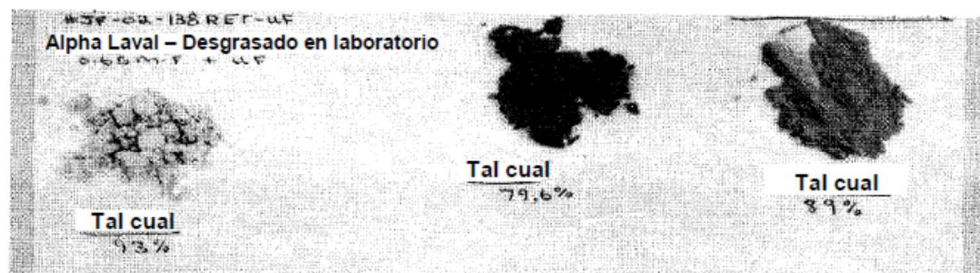


FIGURA 3

FIGURA 4A

Diagrama de flujo del proceso de aislados de proteína con MF

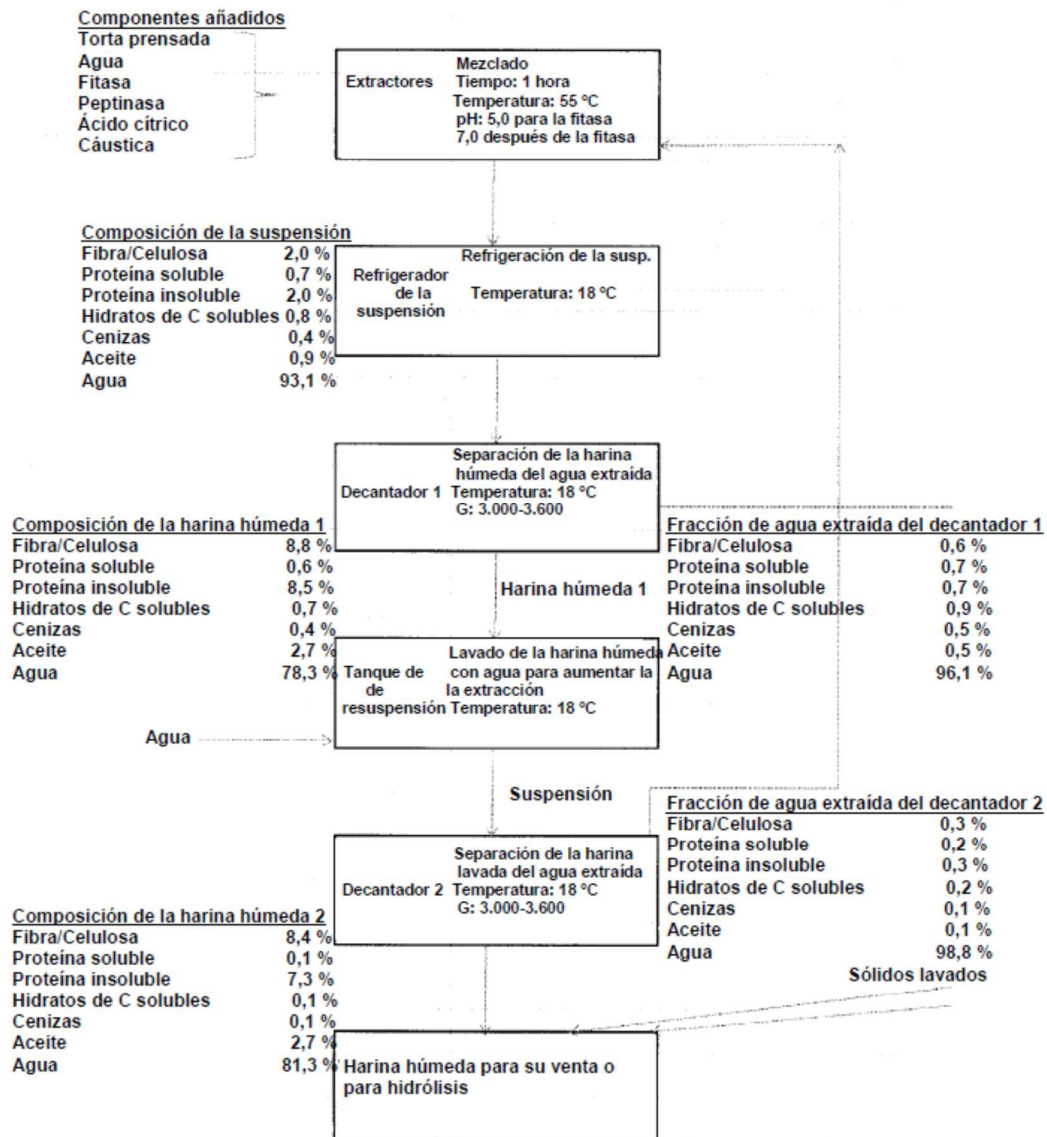
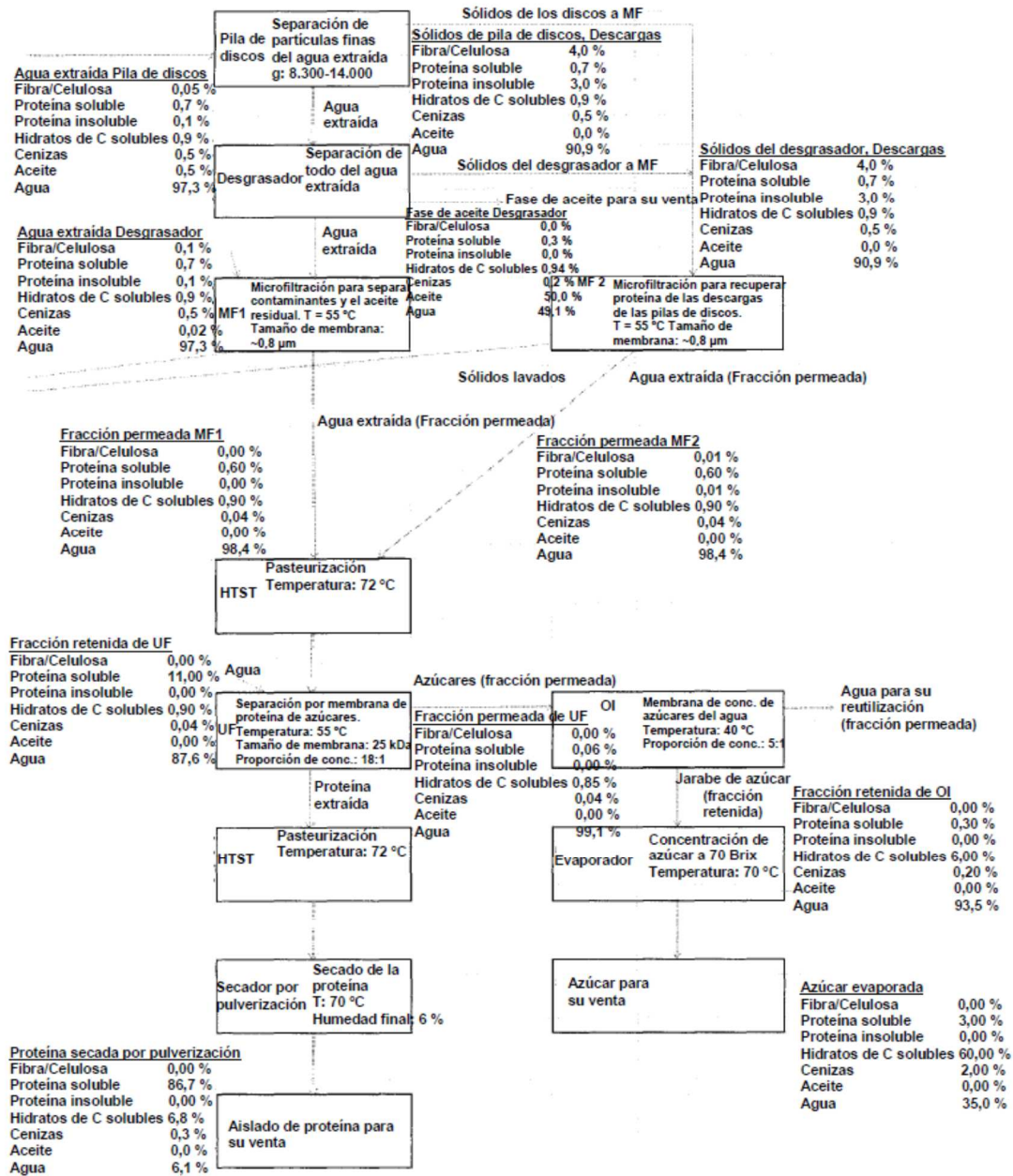


FIGURA 4B



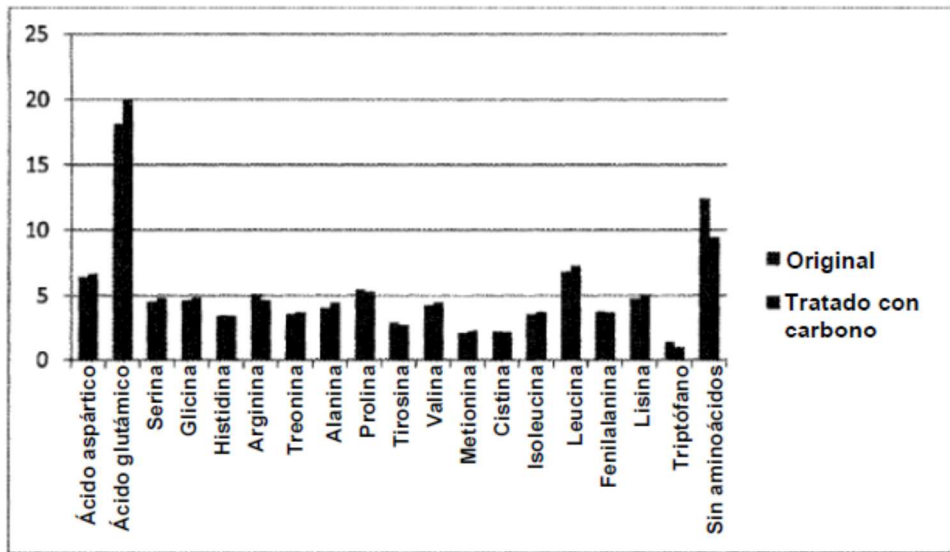


FIGURA 5

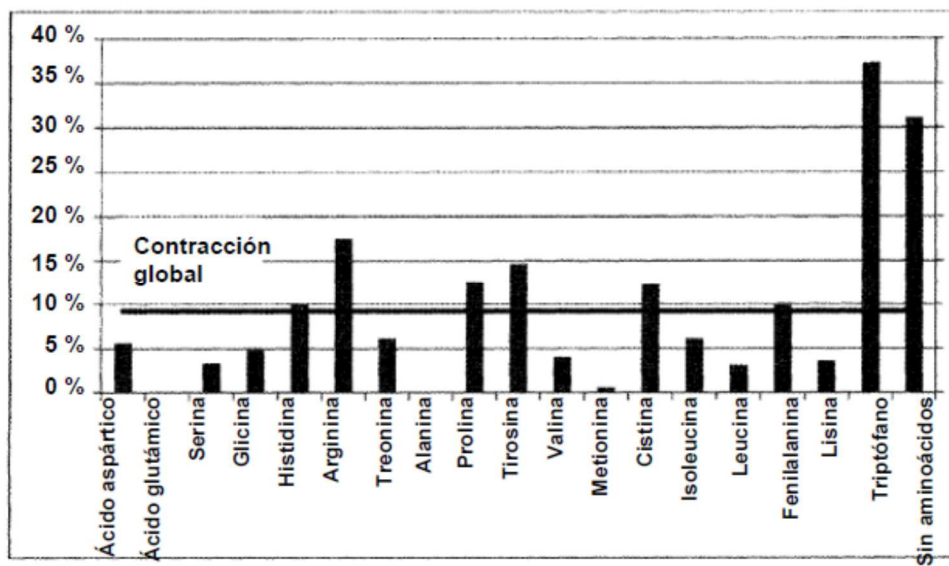


FIGURA 6