



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 903**

51 Int. Cl.:
A23J 1/14 (2006.01)
A23J 3/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03714576 .0**
96 Fecha de presentación : **15.04.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1494541**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.01.2005**

54 Título: **Composiciones de un aislado de proteína de canola.**

30 Prioridad: **15.04.2002 US 372165 P**
04.12.2002 US 430687 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2011

73 Titular/es: **Burcon NutraScience (MB) Corp.**
1388 Waller Avenue
Winnipeg, Manitoba R3T 1P9, CA

72 Inventor/es: **Logie, James y**
Milanova, Radka

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

ES 2 366 903 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

Composiciones de un aislado de proteína de canola

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con los componentes de las proteínas individuales de las composiciones del aislado de proteína de canola.

Antecedentes de la invención

Los aislados de proteína de canola, se pueden fabricar a partir de harina de semillas oleosas de canola. En copending United States Patent Application No. 10/137,391 (US2003/0125526) presentada el 3 de Mayo, 2002, se describe un método para fabricar aislados de proteína de canola a partir de harina de semillas oleosas de canola, tales aislados que tienen al menos un contenido de proteína del 100 % en peso (N x 6.25). El procedimiento involucra un proceso de etapas múltiples que comprende la extracción de harina de semillas oleosas de canola utilizando una solución salina, separación de la resultante solución acuosa de proteína a partir de la harina de semilla oleosa residual, incremento de la concentración de la proteína de la solución acuosa a al menos aproximadamente 200 g/L mientras que conserva la fuerza iónica sustancialmente constante mediante el uso de una técnica de membrana selectiva, dilución de la solución de proteína concentrada resultante en agua fría para provocar la formación de las micelas de proteína, sedimentar las micelas de proteína para formar una masa micelar de proteína (PMM) amorfa, pegajosa, gelatinosa similar al gluten, y recuperación de la masa micelar de proteína a partir del sobrenadante que tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente 100 % en peso, según se determina por nitrógeno de Kjeldahl (N) x 6. 25. Como se utiliza en este documento, el contenido de proteína se determina en base a peso seco. La PMM recuperada se puede secar.

En una modalidad del proceso descrito anteriormente y como se describe específicamente en Application No. 10/137,391 (US2003/0125526), el sobrenadante a partir de la etapa de sedimentación de PMM se procesa para recuperar un aislado de proteína que comprende la proteína seca a partir de la PMM húmeda y el sobrenadante. Este procedimiento se puede llevar a cabo, mediante la concentración inicial del sobrenadante utilizando membranas de ultrafiltración, la mezcla del sobrenadante concentrado con la PMM húmeda y el secado de la mezcla. El aislado de proteína de canola resultante, tiene una pureza alta de al menos aproximadamente 90% en peso de la proteína (N x 6.25), preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso de proteína (N x 6.25).

En otra modalidad del proceso descrito anteriormente y como se describe específicamente en Application No. 10/137,391 (US2003/0125526), el sobrenadante a partir de la etapa de sedimentación de PMM, se procesa para recuperar una proteína a partir del sobrenadante. Este procedimiento se puede llevar a cabo mediante la concentración inicial del sobrenadante utilizando membranas de ultrafiltración y el secado del concentrado. El resultante aislado de proteína de canola tiene una alta pureza de al menos aproximadamente 90% en peso de la proteína (N x 6.25), preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso de la proteína (N x 6.25).

Los procedimientos descritos en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos, mencionadas anteriormente, son esencialmente procedimientos por lotes. En copending United States Patent Application No. 10/298,678 (US2004/0039174), se describe un proceso continuo para fabricar aislados de proteína de canola. En virtud de esta, la harina de semillas oleosas de canola se mezcla continuamente con una solución salina, la mezcla se transporta a través de una tubería mientras que se extrae la proteína a partir de la harina de semillas oleosas de canola para formar una solución acuosa de proteína, la solución acuosa de proteína se separa continuamente de la harina residual de semillas oleosas de canola, la solución acuosa de proteína se transporta continuamente a través de una operación de membrana selectiva para aumentar el contenido de proteína de la solución acuosa de proteína a al menos aproximadamente 200 g/L mientras que conserva la fuerza iónica sustancialmente constante, la solución de proteína concentrada resultante se mezcla continuamente con agua fría para provocar la formación de las micelas de proteína, y las micelas de proteína se dejan decantar continuamente mientras que el sobrenadante se desborda continuamente hasta que la cantidad deseada de PMM se ha acumulado en el recipiente de sedimentación. La PMM se retira del recipiente de sedimentación y se puede secar. La PMM tiene un contenido de proteína de al menos aproximadamente 90% en peso, según se determina por nitrógeno de Kjeldahl (N) x 6.25, preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso (N x 6.25).

Como se describe en la US Patent Application No. 10/137,391 (US2003/0125526), mencionada anteriormente, el sobrenadante desbordado se puede procesar para recuperar el aislado de proteína de canola del mismo.

Se sabe que la semilla de canola contiene cerca de 10 a aproximadamente 30% en peso de las proteínas y varios componentes de proteínas diferentes han sido identificados. Estas proteínas se distinguen mediante los diferentes coeficientes de sedimentación (S). Estas conocidas e identificadas proteínas incluyen una globulina 12S, conocida como cruciferina, y una proteína de almacenamiento 2S, conocida como napina.

La canola también se conoce como colza o aceite de colza.

Japanese patent application No. H03-201611 (publication No. H05-43597) revela un método de separación de la proteína 7S de soja para obtener la proteína con una pureza de más del 85%, preferiblemente más del 90%, por medio de un proceso de precipitación isoeléctrico.

5 German patent application No. DE10035292 revela un método de extracción de una proteína nativa o recombinante a partir de una planta, en particular la extracción de napina, napina-línea 2S albúmina, cruciferina, globulina 11S similar a la legúmina o un anticuerpo de scFv recombinante, por medio de una extracción preliminar seguida por cromatografía de intercambio iónico.

10 Raab et al (Die Nahrung 36 (1992) 3, 239-247) han caracterizado siete variedades de colza mediante la investigación de los patrones de proteínas solubles en solución reguladora utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida y cromatografía líquida de alta resolución (cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio catiónico).

15 Krzyzaniak et al (Die Nahrung 42 (1998) 3/4, 201-204) describe la purificación a homogeneidad de la proteína de almacenamiento albúmina 2S a partir de semillas de colza (napina), y la caracterización de su estructura secundaria y estabilidad conformacional por dicroísmo circular y calorimetría de barrido diferencial de alta sensibilidad.

RESUMEN DE LA INVENCION

20 Además de las proteínas 12S y 2S, hemos encontrado que los procedimientos descritos anteriormente para el aislamiento del aislado de proteína de canola producen cantidades significantes de una proteína 7S, que parece ser una nueva proteína. En consecuencia, en un aspecto de la invención, se proporciona una proteína 7S de canola que se aísla y purifica a partir de una masa micelar de proteína de canola. Preferiblemente, la proteína tiene un peso molecular, según se determina por MALDI-MS, de 145 kDa, preferiblemente compuesta de tres subunidades, cada una con un tamaño aproximado de 413 aminoácidos, que preferiblemente tiene un análisis de aminoácidos sustancialmente como se publica en las siguientes tablas:

TABLA VII

g/100 g de materia seca				
Aminoácido MW(1)	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
133.1	Ácido aspártico	3.18	11.60	3.02
119.1	Treonina	2.70	3.34	1.00
105.1	Serina	3.84	4.52	1.23
204.2	Triptófano	1.16	1.42	0.40
146.1	Ácido glutámico	25.10	21.50	5.91
75.1	Glicina	3.91	5.44	1.45
89.1	Alanina	3.67	4.47	1.18
121.1	Cistina	4.13	1.19	0.34
117.1	Valina	4.02	5.92	1.55
149.2	Metionina	2.55	1.74	0.41
131.2	Isoleucina	2.89	5.12	1.31

(continuación)

g/100 g de materia seca				
Aminoácido MW(1)	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
131.2	Leucina	6.13	8.70	2.31
181.2	Tirosina	1.14	2.67	0.70
165.2	Fenilalanina	2.43	5.01	1.28
155.2	Histidina	2.58	1.60	0.46
146.2	Lisina	5.92	3.17	0.88
174.2	Arginina	5.99	8.02	2.13
115.1	Prolina	9.02	5.83	1.68
	Suma:	90.36	101.26	27.24
	MW Medio de aa (1)	134.61	134.86	134.77
	MW Anhidro (2)	116.59	116.85	116.75
Nota: (1): Peso Molecular de aminoácidos " libre". (2): Peso Molecular Medio del Peso de aminoácidos poliméricos.				

TABLA VIII

Resumen de Aminoácidos: g/100g de Aminoácidos				
Hidrofobicidad: Gibbs: kJ/100g:	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
-	Ácido aspártico*	3.5	11.5	11.1
1.40	Treonina*	3.0	3.3	3.7
-	Serina	4.2	4.5	4.5
6.96	Triptófano*	1.3	1.4	1.5
-	Ácido glutámico*	27.8	21.2	21.7
-	Glicina	43	5.4	5.3
2.35	Alanina	4.1	4.4	4.3
3.45	Cistina*	4.6	1.2	1.2
5.35	Valina*	4.4	5.8	3.7

(continuación)

Resumen de Aminoácidos: g/100g de Aminoácidos				
Hidrofobicidad: Gibbs: kJ/100g:	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
3.64	Metionina*	2.8	1.7	1.3
9.56	Isoleucina*	3.2	5.1	4.8
7.32	Leucina*	6.8	8.6	8.5
5.30	Tirosina	1.3	2.6	2.6
6.33	Fenilalanina*	2.7	4.9	4.7
1.35	Histidina*	2.9	1.6	1.7
-	Lisina*	6.6	3.1	3.2
-	Arginina*	6.6	7.9	7.8
9.44	Prolina	10.0	5.8	6.2
	Suma:	100.0	100.0	100.0
	Suma esenciales: aa	44.8	44.7	44.3
	% de aa hidrófobos:	46.9	46.4	46.3
	Hidrofo. kJ/100g:	214.5	279.3	277.7
e = 11 aminoácidos esenciales aa = aminoácidos				
* Ácido glutámico y ácido aspártico principalmente son amidados a glutamina y asparagina				

5 Preferiblemente, la masa micelar de proteína se forma mediante la dilución de una solución salina concentrada de la proteína de canola extraída a partir de harina de semillas oleosas de canola, bajo condiciones ligeramente ácidas.

10 También hemos encontrado que las proporciones relativas de las proteínas 12S, 7S y 2S difieren entre el aislado de proteína de canola derivado de masa micelar de proteína y el aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante, preparados utilizando los procedimientos descritos anteriormente. En particular, se ha encontrado que el aislado de proteína de canola derivado de PMM, que tiene un contenido de proteína de al menos el 90% en peso (N x 6.25), preferiblemente al menos 100% en peso, tiene un contenido de componente de proteína de 60 a 98% en peso de la proteína 7S, 1 a 15% en peso de la proteína 12S y 0 a 25% en peso de la proteína 2S. Por lo contrario, el aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante que tiene un contenido de proteína de al menos el 90 % en peso (N x 6. 25.), preferiblemente al menos 100% en peso, tiene un contenido de componente de proteína de 0 a 5% en peso de la proteína 12S, 5 a 40% en peso de la proteína 7S y 60 a 95% en peso de la proteína 2S.

15 El aislado de proteína de canola derivado de PMM, preferiblemente tiene un contenido de componente de proteína de 88 a 98% en peso de la proteína 7S, 1 a 10% en peso de la proteína 12S y 0 a 6% en peso de la proteína 2S mientras que el aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante preferiblemente tiene un contenido del componente de proteína de 70 a 95 % en peso de la proteína 2S, 5 a 30 % en peso de la proteína 7S y 0 a 2 % en peso de la proteína 12S.

20 Los perfiles del componente de proteína, por consiguiente, son muy diferentes para los dos aislados de proteína de canola. En el caso del aislado de proteína de canola derivado de PMM, la especie de proteína predominante es la proteína 7S mientras que en el caso del aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante, la especie

predominante es la proteína 2S. Estas diferencias conducen a diferentes comportamientos en ambientes donde los aislados de proteína de canola se emplean.

Los perfiles de contenido de proteínas diferentes permiten composiciones del aislado de proteína de canola que se proporcionan en donde las mezclas de los dos diferentes aislados de proteína de canola se combinan en cualquier proporción deseada para una aplicación específica para proporcionar cualquier perfil de proteínas 2S/7S/12S deseado como entre aquel del aislado derivado de PMM y aquel del derivado del sobrenadante

La variación en las proporciones de las proteínas 12S/7S/2S en un aislado de proteína de canola derivado de PMM específico y/o un aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante específico, se puede lograr mediante la variación de las condiciones del proceso utilizadas para derivar los respectivos aislados de proteína de canola a partir de harina de semillas oleosas de canola.

Los componentes individuales del aislado de proteína de canola han sido aislados, purificados y caracterizados. Las proteínas individuales se pueden separar a partir de los respectivos aislados de proteína de canola derivados de la PMM y del sobrenadante, producidos de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente mediante cualquier procedimiento convencional, por el cual las mezclas de proteínas se pueden separar basándose en las diferencias en tamaño, preferiblemente por cromatografía líquida de alta resolución preparativa (HPLC), seguido por ultrafiltración para reducir el volumen del eluyente y diálisis para reducir el contenido residual de sal de solubilización. El material dializado se puede secar para retirar la proteína pura.

El procedimiento para el aislamiento y purificación de unas proteínas de canola individuales a partir de un aislado de proteína de canola, que contiene una mezcla de al menos dos diferentes proteínas de canola seleccionadas del grupo que consiste de las proteínas 2S, 7S y 12S, incluyendo el aislado de proteína de canola derivado de PMM y el aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante descritos en este documento, constituye otro aspecto de la invención.

La proteína 2S por lo general se aísla y purifica a partir del aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante mientras que las proteínas 7S y 12S por lo general se aíslan y purifican a partir de la masa micelar de proteína. La proteína 2S tiene un peso molecular, según se determina por MALDI-MS, de aproximadamente 14 kDa, la proteína 7S tiene un peso molecular, según se determina por MALDI-MS, de aproximadamente 145 kDa y la proteína 12S tiene un peso molecular, según se determina por MALDI-MS, de aproximadamente 290 kDa.

Las proteínas 7S y 12S tienen un perfil de aminoácidos muy similar y se componen de un número de las mismas subunidades, que contiene cada una aproximadamente 413 aminoácidos. La proteína 7S contiene aproximadamente 1240 aminoácidos, mientras que la proteína 12S contiene aproximadamente 2480 aminoácidos. La proteína 2S tiene un perfil de aminoácidos muy diferente a partir de las proteínas 7S y 12S y contiene aproximadamente 120 aminoácidos. Los perfiles de aminoácidos obtenidos se publican a continuación en los Ejemplos.

El suministro de las proteínas 2S, 7S y 12S de canola purificadas y aisladas individuales permite que se produzcan las composiciones de la proteína 7S con diferentes proporciones de las proteínas 12S y/o 2S, con el fin de proporcionar las composiciones que pueden tener funcionalidades únicas en el uso de las proteínas purificadas.

Los aislados de proteína de canola producidos de acuerdo con el proceso en este documento pueden ser utilizados en aplicaciones convencionales del aislado de proteínas, tales como, fortificación de las proteínas de alimentos procesados, emulsificación de aceites, formadores de cuerpo en productos de horneado y agentes espumantes en productos que atrapan gases. Además, los aislados de proteína de canola se pueden formar en fibras de proteína, útiles en análogos de la carne, pueden ser utilizados como un sustituto de la clara de huevo o extensor en productos alimenticios donde la clara de huevo se utiliza como un ligante. El aislado de proteína de canola puede ser utilizado como suplemento nutricional. Otros usos del aislado de proteína de canola son en alimentos para mascotas, piensos para animales y en aplicaciones industriales y cosméticas y en productos para el cuidado personal. Las proteínas individuales aisladas y purificadas pueden ser objeto de un uso similar.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1 es un diagrama de flujo esquemático de un procedimiento para producir aislados de proteína de canola de los diferentes perfiles de proteínas;

Figura 2 es un diagrama de flujo esquemático de un procedimiento continuo para producir aislados de proteína de canola de los diferentes perfiles de proteínas;

Figuras 3 a 5 son cromatogramas de HPLC analítica de extractos a partir de harina de temperatura baja; y

Figuras 6 y 7 contienen la superposición de siete corridas consecutivas de HPLC preparativa, para la recolección de las proteínas individuales de canola 2S, 7S y 12S.

DESCRIPCIÓN GENERAL DE LA INVENCION

5 El respectivo aislado de proteína de canola derivado de PMM y aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante se pueden aislar a partir de harina de semillas oleosas de canola por ya sea, un proceso por lote o un proceso continuo o un proceso semi-continuo como se describe por lo general en las solicitudes de patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente.

10 La etapa inicial del proceso para proporcionar los aislados de proteína de canola, involucra material proteináceo solubilizante a partir de harina de semillas oleosas de canola. El material proteináceo recuperado a partir de la harina de semilla de canola puede ser la proteína que ocurre naturalmente en la semilla de canola u otra semilla oleosa o el material proteináceo puede ser una proteína modificada por manipulación genética pero que posee características hidrofóbicas y propiedades polares de la proteína natural. La harina de canola puede ser cualquier harina de canola como resultado de la eliminación del aceite de canola de las semillas oleosas de canola con diferentes niveles de proteína no-desnaturalizada, que resulta, por ejemplo, a partir de la extracción con hexano 15 caliente o métodos de extrusión de aceite frío. La eliminación de aceite de canola a partir de semillas oleosas de canola por lo general se lleva a cabo como una operación separada a partir del procedimiento de recuperación del aislado de proteína descrito en este documento.

20 La solubilización de la proteína se lleva a cabo más eficientemente, mediante el uso de una solución salina de grado alimenticio, dado que la presencia de la sal aumenta la eliminación de la proteína soluble a partir de la harina de semilla oleosa. Donde el aislado de proteína de canola está destinado a usos no-alimentarios, se pueden utilizar productos químicos de grado no alimentario. La sal por lo general es cloruro de sodio, aunque otras sales, tales como, cloruro de potasio, pueden ser utilizadas. La solución salina tiene una fuerza iónica de al menos aproximadamente 0.10, preferiblemente al menos aproximadamente 0.15, para permitir que la solubilización de cantidades significantes de la proteína, se lleve a cabo. Como la fuerza iónica de la solución salina incrementa, el 25 grado de solubilización de la proteína en la harina de semilla oleosa inicialmente incrementa hasta que se logra un valor máximo. Cualquier posterior aumento en la fuerza iónica no incrementa la proteína solubilizada total. La fuerza iónica de la solución salina de grado alimenticio que causa máxima solubilización de la proteína varía en función de la sal que se trate y la harina de semilla oleosa elegida.

30 En vista del mayor grado de dilución necesario para la precipitación de la proteína con el incremento de fuerzas iónicas, por lo general se prefiere utilizar un valor de fuerza iónica menor de aproximadamente 0.8, y más preferiblemente un valor de aproximadamente 0.15 a aproximadamente 0.6.

35 En un proceso por lote, la solubilización con sal de la proteína se lleva a cabo a una temperatura de al menos aproximadamente 5°C y preferiblemente hasta aproximadamente 35°C, preferiblemente acompañada por agitación para disminuir el tiempo de solubilización, que es por lo general aproximadamente 10 a aproximadamente 60 minutos. Se prefiere realizar la solubilización para extraer sustancialmente tanta proteína a partir de la harina de semilla oleosa como sea posible, con el fin de proporcionar una producción completa del producto alta.

La temperatura límite inferior de aproximadamente 5°C se elige, dado que la solubilización es excesivamente lenta por debajo de esta temperatura mientras que el límite de temperatura superior preferido de aproximadamente 35°C se elige dado que el proceso se convierte en no rentable a niveles de temperatura superiores en un modo por lotes.

40 En un proceso continuo, la extracción de la proteína a partir de la harina de semillas oleosas de canola se lleva a cabo de una manera consistente, realizando una extracción continua de la proteína a partir de la harina de semillas oleosas de canola. En una modalidad, la harina de semillas oleosas de canola se mezcla continuamente con una solución salina de grado alimenticio y la mezcla se transporta a través de una tubería o conducto que tiene una longitud y a una velocidad de flujo por un tiempo de residencia suficiente para realizar la extracción deseada de 45 acuerdo con los parámetros descritos en este documento. En dicho procedimiento continuo, la etapa de solubilización con sal se lleva a cabo rápidamente, en un tiempo de hasta aproximadamente 10 minutos, preferiblemente para realizar la solubilización para extraer sustancialmente tanta proteína a partir de la harina de semillas oleosas de canola como sea posible. La solubilización en el procedimiento continuo preferiblemente se realiza a temperaturas elevadas, preferiblemente aproximadamente por encima de 35°C, por lo general hasta 50 aproximadamente 65°C.

La solución acuosa salina de grado alimenticio y la harina de semillas oleosas de canola tienen un pH natural de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.8, para permitir que un aislado de proteína se forme mediante la ruta micelar, como se describe con más detalle a continuación.

En y cerca de los límites del rango de pH, la formación del aislado de proteína ocurre solo en parte a través de la ruta de micela y en rendimientos bajos que pueden lograr en el resto del rango de pH. Por estas razones, se prefieren los valores de pH ligeramente ácidos de aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.2.

- 5 El pH de la solución salina se puede ajustar a cualquier valor deseado dentro del rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.8 para utilizar en la etapa de extracción mediante el uso de cualquier ácido conveniente, generalmente por ácido clorhídrico, o bases, por lo general hidróxido de sodio, según sea necesario.

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

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

- 15 La solución de proteína resultante a partir de la etapa de extracción por lo general tiene una concentración de proteína de aproximadamente 5 a aproximadamente 40 g/L, preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 30 g/L.

La fase acuosa resultante a partir de la etapa de extracción, a continuación se puede separar a partir de la harina de canola residual, de cualquier manera conveniente, tal como empleando filtración con vacío, seguido por centrifugación y/o filtración para retirar la harina residual. La harina residual separada se puede secar para su eliminación.

- 20 El color del aislado de proteína de canola final se puede mejorar en términos de color claro y amarillo menos intenso por la mezcla de carbón activado en polvo u otro agente que absorba el pigmento con la solución acuosa de proteína separada y posteriormente la eliminación del adsorbente, convenientemente por filtración, para proporcionar una solución de proteína. La diafiltración también puede ser utilizada para la eliminación del pigmento.

- 25 Dicha etapa de eliminación del pigmento, se puede llevar a cabo bajo cualquiera de las condiciones convenientes, por lo general a la temperatura ambiente de la solución acuosa de proteína separada, empleando cualquier agente apropiado que absorba el pigmento. Para el carbón activado en polvo, una cantidad de aproximadamente 0.025% a aproximadamente 5% peso/v, preferiblemente aproximadamente 0.05% a aproximadamente 2% peso/v, se emplea.

- 30 Cuando la harina de semilla de canola contiene cantidades significantes de grasa, como se describe en US Patents Nos. 5,844,086 y 6,005,076, asignadas al cesionario de este y las divulgaciones de las cuales se incorporan en este documento por referencia, a continuación las etapas de pérdida de grasa descritas en esta se pueden llevar a cabo en la solución acuosa de proteína separada y en la solución acuosa de proteína concentrada se discuten a continuación. Cuando la etapa de mejora de color se lleva a cabo, dicha etapa se puede llevar a cabo después de la primera etapa de pérdida de grasa.

- 35 Como alternativa a la extracción de la harina de semilla oleosa con una solución acuosa salina, tal extracción se puede hacer utilizando solo agua, aunque el uso de solo agua tiende a extraer menos proteína de la harina de semilla oleosa, que la solución acuosa salina. Cuando dicha alternativa se emplea, luego la sal, en las concentraciones discutidas anteriormente, se puede adicionar a la solución de proteína después de la separación de la harina de semilla oleosa residual con el fin de mantener la proteína en solución durante la etapa de concentración descrita a continuación. Cuando una etapa de eliminación del color y/o una primera etapa de eliminación de grasa se lleva a cabo, por lo general la sal se adiciona después de la finalización de tales operaciones.

- 40 Otro procedimiento alternativo es extraer la harina de semilla oleosa con la solución salina de grado alimenticio a un valor de pH relativamente alto por encima de aproximadamente 6.8, por lo general hasta aproximadamente 9.9. El pH de la solución salina de grado alimenticio, se puede ajustar el pH al valor alcalino deseado mediante el uso de cualquier base de grado alimenticio conveniente, tal como solución acuosa de hidróxido de sodio. Alternativamente, 45 la harina de semilla oleosa se puede extraer con la solución salina a un pH relativamente bajo por debajo de pH 5, por lo general a aproximadamente pH 3. Cuando dicha alternativa se emplea, la fase acuosa resultante a partir de la etapa de extracción de la harina de semilla oleosa, a continuación se separa de la harina residual de canola, de cualquier manera conveniente, tal como empleando filtración con vacío, seguido por centrifugación y/o filtración para retirar la harina residual. La harina residual separada se puede secar para su eliminación.

- 50 La solución acuosa de proteína resultante a partir de la etapa de extracción a pH bajo o alto, luego se ajusta el pH al rango de aproximadamente 5 a aproximadamente 6.8, preferiblemente aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.2, como se discute anteriormente, antes de su procesamiento como se discute a continuación. Tal ajuste del pH se

puede llevar a cabo utilizando cualquier ácido conveniente, tal como ácido clorhídrico, o base, tal como hidróxido de sodio, según sea apropiado.

5 La solución acuosa de proteína, luego se concentra para aumentar la concentración de la proteína de la misma mientras que conserva su fuerza iónica sustancialmente constante. Tal concentración, por lo general se lleva a cabo para proporcionar una solución de proteína concentrada que tiene una concentración de la proteína de al menos aproximadamente 200 g/L, preferiblemente al menos aproximadamente 250 g/L.

10 La etapa de concentración se puede llevar a cabo de cualquier manera conveniente consistente con la operación por lote o continua, tal como empleando cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración o diafiltración, utilizando membranas, tales como membranas de fibra hueca o membranas en espiral, con un corte de peso molecular apropiado, tal como aproximadamente 3000 a aproximadamente 50,000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales de membrana y configuraciones, y, para operación continua, dimensionada para permitir el grado de concentración deseado como la solución acuosa de proteína pasa a través de las membranas.

15 La etapa de concentración se puede llevar a cabo a cualquier temperatura conveniente, por lo general aproximadamente 20° a aproximadamente 60°C, y durante el periodo de tiempo para realizar el grado de concentración deseado. La temperatura y otras condiciones utilizadas en algún grado dependen del equipo de membrana utilizado para realizar la concentración y la concentración deseada de la proteína de la solución.

20 La concentración de la solución de proteína a una concentración arriba de aproximadamente 200 g/L en esta etapa no solo incrementa el rendimiento del proceso a niveles por encima de aproximadamente 40% en términos de la proporción de proteína extraída que se recupera como aislado de proteína seco, preferiblemente arriba de aproximadamente 80%, pero también disminuye la concentración de la sal del aislado de proteína final después del secado. La capacidad de controlar la concentración de la sal del aislado es importante en las aplicaciones del aislado donde las variaciones en las concentraciones de sal afectan las propiedades funcionales y sensoriales en una aplicación para alimentos específicos.

25 Como es bien conocido, la ultrafiltración y la técnica similar de membrana selectiva permite que las especies de bajo peso molecular pasen a través, mientras que impiden de esta manera que las especies de un peso molecular mayor pasen. Las especies de bajo peso molecular incluyen no solo la especie iónica de la sal sino también materiales de bajo peso molecular extraído a partir del material fuente, tal como, carbohidratos, pigmentos y factores anti-nutricionales, así como cualquier forma de bajo peso molecular de la proteína. El corte de peso molecular de la membrana, por lo general se selecciona para asegurar la retención de una proporción significativa de la proteína en la solución, mientras que permite que los contaminantes pasen a través teniendo en cuenta a los diferentes materiales de membrana y las configuraciones.

35 Dependiendo de la temperatura empleada en la etapa de concentración, la solución de proteína concentrada se puede calentar a una temperatura de al menos aproximadamente 20°, y hasta aproximadamente 60°C, preferiblemente aproximadamente 25° a aproximadamente 40°C, para disminuir la viscosidad de la solución de proteína concentrada para facilitar la realización de la posterior etapa de dilución y la formación de micelas. La solución de proteína concentrada no se debería calentar más allá de una temperatura superior que la temperatura de la solución de proteína concentrada no permita la formación de micelas en dilución mediante agua fría. La solución de proteína concentrada se puede someter a otra operación de pérdida de grasa, si es necesario, como se describe en US Patents Nos. 5,844,086 y 6,005,076.

40 La solución de proteína concentrada resultante a partir de la etapa de concentración y la opcional etapa de pérdida de grasa, luego se diluye para realizar la formación de micelas mediante la mezcla de la solución de proteína concentrada con agua fría que tiene el volumen necesario para lograr el grado de dilución deseado. Dependiendo de la proporción de la proteína de canola deseado que se obtiene por la ruta de micela y la proporción a partir del sobrenadante, el grado de dilución de la solución de proteína concentrada se puede variar. Con niveles de dilución superiores, en general, una mayor proporción de la proteína de canola permanece en la fase acuosa.

45 Cuando se desea proporcionar la mayor proporción de la proteína por la ruta de micela, la solución de proteína concentrada se diluye por aproximadamente 15 veces o menos, preferiblemente aproximadamente 10 veces o menos.

50 El agua fría con la cual la solución de proteína concentrada se mezcla tiene una temperatura de menos de aproximadamente 15°C, por lo general aproximadamente 3°C a aproximadamente 15°C, preferiblemente menos de aproximadamente 10°C, dado que los rendimientos mejorados del aislado de proteína en la forma de la masa micelar de proteína se logran con estas temperaturas más frías a los factores de dilución utilizados.

En una operación por lotes, el lote de solución de proteína concentrada se adiciona a un cuerpo estático de agua fría que tiene el deseado volumen, como se discute anteriormente. La dilución de la solución de proteína concentrada y

- la disminución importante en fuerza iónica causa la formación de una masa similar a una nube de moléculas de proteínas altamente asociadas en la forma de gotitas de proteínas discretas en forma micelar. En el procedimiento por lotes, la micela de proteína se deja sedimentar en el cuerpo de agua fría para formar una masa micelar de proteína (PMM) agregada, unificada, densa, amorfa pegajosa similar al gluten. La sedimentación se puede ayudar, como por centrifugación. Dicha sedimentación inducida disminuye el líquido contenido de la masa micelar de proteína, lo que disminuye el contenido de humedad por lo general de aproximadamente 70% en peso a aproximadamente 95% en peso a un valor de por lo general cerca del 50% en peso a aproximadamente 80% en peso de la masa micelar total. Disminuyendo el contenido de humedad de la masa micelar de esta manera también se reduce el contenido de sal ocluido de la masa micelar, y por lo tanto el contenido de sal del aislado seco.
- Por otra parte, la operación de dilución se puede llevar a cabo de manera continua, pasando continuamente la solución de proteína concentrada a una entrada de una tubería en forma de T, mientras que el agua de dilución se alimenta a la otra entrada de la tubería en forma de T, lo que permite la mezcla en la tubería. El agua de dilución se alimenta en la tubería en forma de T a una velocidad suficiente para lograr el grado deseado de dilución.
- La mezcla de la solución de proteína concentrada y el agua de dilatación en la tubería inicia la formación de las micelas de proteína y la mezcla se alimenta continuamente a partir de la salida de la tubería en forma de T en un recipiente de sedimentación, a partir del cual, cuando está lleno, el sobrenadante se deja desbordar. La mezcla preferiblemente se alimenta en el cuerpo del líquido en el recipiente de sedimentación de manera que minimiza la turbulencia dentro del cuerpo del líquido.
- En el procedimiento continuo, las micelas de proteína se dejan sedimentar en el recipiente de sedimentación para formar una masa micelar de proteína (PMM) agregada, unificada, densa, amorfa, pegajosa, similar al gluten y el procedimiento se continúa hasta que una deseada cantidad de la PMM se ha acumulado en el fondo del recipiente de sedimentación, con lo cual la PMM acumulada, se retira del recipiente de sedimentación.
- La combinación de los parámetros del proceso de concentración de la solución de proteína a un contenido de proteína de al menos aproximadamente 200 g/L y el uso de un factor de dilución menor de aproximadamente 15, da lugar a rendimientos mayores, a menudo rendimientos significativamente mayores, en términos de recuperación de la proteína en la forma de la masa micelar de proteína a partir del extracto de harina original, y aislados mucho más puros en términos del contenido de proteína que se logran utilizando cualquiera de los procedimientos que forman aislados de proteína conocidos del oficio previo discutidos en las patentes de Estados Unidos, mencionadas anteriormente.
- Por el uso de un proceso continuo para la recuperación del aislado de proteína de canola en comparación con el proceso por lote, la etapa inicial de extracción de la proteína se puede reducir significativamente en tiempo para el mismo nivel de extracción de la proteína y temperaturas significativamente superiores se pueden emplear en la etapa de extracción. Además, en una operación continua, existe menos probabilidad de contaminación que en un procedimiento por lotes, lo que lleva a una calidad superior del producto y el proceso se puede llevar a cabo en un equipo más compacto.
- El aislado sedimentado se separa a partir de la fase acuosa o del sobrenadante residual, como por decantación de la fase acuosa residual a partir de la masa sedimentada o por centrifugación. La PMM puede ser utilizada en forma húmeda o se puede secar, por cualquier técnica conveniente, tal como secado por atomización, liofilización o secado con tambor al vacío, a una forma seca. La PMM seca tiene un alto contenido de proteína, en exceso de aproximadamente 90% en peso de la proteína, preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso de la proteína (calculado como Kjeldahl N x 6.25), y sustancialmente es sin desnaturalizar (según se determina por calorimetría de barrido diferencial). La PMM seca aislada a partir de harina de semilla oleosa grasa también tiene un contenido de grasa residual bajo, cuando se emplean los procedimientos de USPs 5,844,086 y 6,005,076, el cual puede estar por debajo de 1% en peso.
- El aislado de proteína de canola derivado de PMM, predominantemente consiste de la proteína de canola 7S con menores cantidades de la proteína 12S de canola y opcionalmente pequeñas cantidades de la proteína de canola 2S. En general, la PMM contiene:
- aproximadamente 60 a aproximadamente 98% en peso de la proteína 7S
 - aproximadamente 1 a aproximadamente 15% en peso de la proteína 12S
 - 0 a aproximadamente 25% en peso de la proteína 2S

Preferiblemente, la PMM contiene:

- aproximadamente 88 a aproximadamente 98% en peso de la proteína 7S

aproximadamente 1 a aproximadamente 10% en peso de la proteína 12S

0 a aproximadamente 6% en peso de la proteína 2S

El sobrenadante a partir de la formación de PMM y la etapa de sedimentación contiene cantidades significantes de la proteína de canola, no precipitadas en la etapa de dilución, y se procesa para recuperar el aislado de proteína de canola de la misma. El sobrenadante a partir de la etapa de dilución, después de la eliminación de la PMM, se concentra para aumentar las concentraciones de proteína de esta. Tal concentración se lleva a cabo utilizando cualquier técnica de membrana selectiva conveniente, tal como ultrafiltración, utilizando membranas con un corte de peso molecular apropiado que permiten que las especies de bajo peso molecular, incluyendo la sal y otros materiales no-proteináceos de bajo peso molecular extraídos a partir de la proteína material fuente, pasen a través de la membrana, mientras que retienen la proteína de canola en la solución. Las membranas de ultrafiltración que tienen un corte de peso molecular de aproximadamente 3000 a 10,000 daltons, teniendo en cuenta los diferentes materiales de membrana y la configuración, pueden ser utilizadas. La concentración del sobrenadante, de esta manera también reduce el volumen de líquido necesario que se seca para recuperar la proteína. El sobrenadante por lo general se concentra a una concentración de la proteína de aproximadamente 100 a aproximadamente 400 g/L, preferiblemente aproximadamente 200 a aproximadamente 300 g/L, antes de secar. Tal operación de concentración se puede llevar a cabo en un modo por lotes o en una operación continua, como se describe anteriormente para la etapa de la concentración de la solución de proteína.

El sobrenadante concentrado se puede secar por cualquier técnica conveniente, tal como secado por atomización, liofilización o secado con tambor al vacío, a una forma seca para proporcionar otro aislado de proteína de canola. Otro aislado de proteína de canola tiene un alto contenido de proteína, en exceso de aproximadamente 90% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso de la proteína (calculado como Kjeldahl N x 6.25) y sustancialmente es sin desnaturalizar (según se determina por calorimetría de barrido diferencial).

El sobrenadante seco predominantemente consiste de la proteína de canola 2S con menores cantidades de la proteína de canola 7S y opcionalmente pequeñas cantidades de la proteína 12S de canola. En general, el aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante contiene:

aproximadamente 60 a aproximadamente 95% en peso de la proteína 2S

aproximadamente 5 a aproximadamente 40% en peso de la proteína 7S

0 a aproximadamente 5% en peso de la proteína 12S

El aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante preferiblemente contiene:

aproximadamente 70 a aproximadamente 95% en peso de la proteína 2S

aproximadamente 5 a aproximadamente 30% en peso de la proteína 7S

0 a aproximadamente 2% en peso de la proteína 12S

Si se desea, al menos una porción de la PMM húmeda se puede combinar con al menos una porción del sobrenadante concentrado antes de secar las corrientes de proteína combinadas por cualquier técnica conveniente para proporcionar una composición del aislado de proteína de canola combinada. Las proporciones relativas del material proteináceo mezcladas juntas se pueden seleccionar para proporcionar una composición del aislado de proteína de canola resultante que tiene un perfil deseado de las proteínas 2S/7S/12S. Alternativamente, los aislados de proteína secos se pueden combinar en cualquier proporción deseada para proporcionar cualquier perfil deseado de las proteínas específicas 2S/7S/12S en la mezcla. La composición del aislado de proteína de canola combinada tiene un alto contenido de proteína, en exceso de aproximadamente 90% en peso, preferiblemente al menos aproximadamente 100% en peso, (calculado como Kjeldahl N x 6.25) y sustancialmente es sin desnaturalizar (según se determina por calorimetría de barrido diferencial).

En otro procedimiento alternativo, donde solamente una porción del sobrenadante concentrado se mezcla con una sola parte de la PMM y la mezcla resultante se seca, el resto del sobrenadante concentrado se puede secar al igual que cualquiera del resto de la PMM. Además, la PMM seca y el sobrenadante seco también se pueden secar mezclados en cualquiera de las proporciones relativas deseadas, como se discute anteriormente.

Al operar de esta manera, un número de los aislados de proteína de canola se puede recuperar, en la forma de PMM seca, sobrenadante seco y las mezclas secas de varias proporciones en peso del aislado de proteína de canola derivado de PMM y el aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante, por lo general a partir de aproximadamente 5:95 a aproximadamente 95:5 en peso, lo que puede ser conveniente para la consecución de

diferentes propiedades funcionales y nutricionales basándose en las diferentes proporciones de las proteínas 2S/7S/12S en las composiciones.

Como una alternativa a la dilución de la solución de proteína concentrada en agua fría y el procedimiento del precipitado y sobrenadante resultante como se describe anteriormente, la proteína se puede recuperar a partir de la solución de proteína concentrada mediante la diálisis de la solución de proteína concentrada para reducir el contenido de sal de este. La reducción del contenido de sal de la solución de proteína concentrada da lugar a la formación de las micelas de proteína en la tubería de diálisis. Después de la diálisis, las micelas de proteína se pueden dejar sedimentar, recolectar y secar, como se discute anteriormente. El sobrenadante a partir de la etapa de sedimentación de la micela de proteína se puede procesar, como se discute anteriormente, para recuperar más proteínas de la misma. Alternativamente, los contenidos de la tubería de diálisis se pueden secar directamente. El último procedimiento alternativo es útil cuando pequeñas cantidades a escala de laboratorio de la proteína se desean.

Las cantidades relativas de las proteínas respectivas en cualquier aislado de proteína dado, se pueden determinar por cualquiera de las técnicas analíticas, tales como una técnica de separación analítica. La más común de estas técnicas utiliza medios selectivos en una columna que permite la separación basándose en el tamaño. Para aplicaciones de cromatografía de permeación en gel (GPC), materiales similares a gel esférico se utilizan. Cuando se utiliza la presión, como en cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), entonces se utiliza un medio rígido. La última técnica también se conoce como cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Los resultados obtenidos utilizando tales técnicas en muestras de aislado de proteína de canola preparado como se describe en este documento están contenidos en los siguientes Ejemplos.

El procedimiento de espectroscopía de masas (MS) puede ser utilizado para identificar y analizar muestras de proteína, incluyendo las proteínas 2S, 7S y 12S de canola descritas en este documento. En la espectroscopía de masas por ionización electrospray (ESI); la proteína se bombardea con electrones de baja energía y fragmentos cargados o especies formadas a partir de la colisión se detectan. En particular, un espectrómetro de masas para ionización desorción por láser asistido de matriz (MALDI) puede ser utilizado en donde existe vaporización con láser de una muestra seca del material para el análisis que contiene una matriz molecular específica. La matriz contiene una compatible, molécula orgánica de peso molecular pequeño que protege el biopolímero bajo análisis lo suficiente para reducir el número de especies ionizadas producidas a partir de la energía de impacto del láser.

Los datos derivados a partir del aislado de muestras de proteína como se describe en este documento sugieren que la proteína 2S no es estable al bombardeo del electrón por ESI-MS y fácilmente se fragmenta en numerosos fragmentos del polipéptido, que incluyen especies 4 kDa, 10 kDa y 21 kDa. Utilizando MALDI-MS, sin embargo, se produce una fracción 2S intacta con una masa molecular de cerca de 14,000 daltons.

La proteína 7S en el derivado de PMM de proteína aislado también produjo un gran número de fragmentos sub-10 kDa, que sugieren la inestabilidad molecular al bombardeo del electrón en ESI-MS. Además, una especie de 21 kDa fue identificada en análisis de la proteína 7S a partir del aislado de proteína de canola derivado de PMM, pero esta especie estuvo ausente en la proteína 7S a partir del aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante.

El análisis ESI-MS de la proteína 7S, a partir del aislado de proteína de canola derivado de PMM también indicó seis masas moleculares de proteína que oscilan de 126 a 166 kDa, mientras que la proteína 7S a partir del aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante indicó una especie grande a 167 kDa.

Los resultados del análisis MALDI-MS descritos en este documento indican que la proteína 2S tiene una masa molecular entre 13,960 y 14,250 da y es muy resistente al tratamiento con ácido suave. Las proteínas 7S y 12S se componen de los mismos unidades estructurales con una subunidad básica de 48,200 a 48,400 da. La proteína 7S tiene una masa molecular de tres subunidades o aproximadamente 145,000 da, de masa molecular, mientras que la proteína 12S contiene 6 subunidades con una masa molecular combinada de aproximadamente 290,000 da. La hidrólisis ácida de las proteínas 7S y 12S, no produce la proteína 2S y produjo resultados casi idénticos, confirmando que estas dos proteínas globulares se obtienen de la misma subunidad.

Las proteínas individuales 2S, 7S y 12S se pueden aislar y purificar a partir de los respectivos aislados de proteínas por cualquier procedimiento convencional, incluyendo cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) analítica para pequeñas cantidades de la proteína y HPLC preparativa para grandes cantidades. Otros procedimientos que logran la composición sobre la base de masa molecular pueden ser utilizados. La proteína 2S por lo general se aísla y purifica a partir del aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante mientras que las proteínas 7S y 12S por lo general se aíslan y purifican a partir del aislado de proteína de canola derivado de PMM. El aislado de proteína de canola se solubiliza, tal como mediante el uso de solución salina, y luego se pasa a través de la columna de HPLC. Las proteínas separadas por HPLC contenidas en las fracciones del eluyente que contienen una de las proteínas, por lo general se someten a ultrafiltración para reducir el volumen del eluyente seguido por la diálisis del aislado de proteína para reducir el contenido de sal residual en las proteínas. El material dializado se puede secar para proporcionar la proteína de canola individual aislada y purificada seca.

DESCRIPCIÓN DE LAS MODALIDADES PREFERIDAS

Refiriéndose a la Figura 1, se ilustra esquemáticamente un diagrama de flujo de un proceso por lote para la preparación de los aislados de proteína de canola. La harina de semilla oleosa de canola y el medio de extracción acuoso se alimentan por la línea 10 a un recipiente de extracción 12, en donde la harina de semilla oleosa se extrae y una solución acuosa de proteína se forma. La lechada de la solución acuosa de proteína y la harina de semilla oleosa residual se pasan por la línea 14 a un cinturón de filtro de vacío 16, para la separación de la harina de semilla oleosa residual que se retira por la línea 18. La solución acuosa de proteína, a continuación se pasa por la línea 20 a una operación de clarificación 22, en donde la solución acuosa de proteína se centrifuga y filtra para retirar los finos, que se recuperan por la línea 24.

- 5 La solución acuosa de proteína clarificada se bombea por la línea 26 a través de una membrana de ultrafiltración 28, para producir una solución de proteína concentrada como el retenido en la línea 30, con el permeado que se recupera por la línea 32. La solución de proteína concentrada se pasa en un recipiente de precipitación 34 que contiene agua fría alimentada por la línea 36. La masa micelar de la proteína formada en el recipiente de precipitación 34 se retira por la línea 38 y se pasa a través de un secador por atomización 40 para proporcionar el aislado de proteína de canola seco 42.

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

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

Refiriéndose a la Figura 2, se ilustra esquemáticamente un diagrama de flujo de un proceso continuo para la preparación de los aislados de proteína de canola. La harina de semilla oleosa de canola y el medio de extracción acuoso se alimentan por las líneas 110 y 112 respectivamente a un mezclador 114 en donde la harina de semilla oleosa y el medio de extracción acuoso se mezclan y la mezcla se pasa por la línea 116 a una tubería de mezcla 118. En la tubería de mezcla 118, la harina de semilla oleosa se extrae y una solución acuosa de proteína se forma. La lechada de solución acuosa de proteína y harina de semilla oleosa residual se pasan por la línea 120 a un cinturón de filtro de vacío 122, para la separación de la harina de semilla oleosa residual que se retira por la línea 124. La solución acuosa de proteína luego se pasa por la línea 126 a una operación de clarificación 128 en donde la solución acuosa de proteína se centrifuga y filtra para retirar los finos, que se recuperan por la línea 130.

- 30 La solución acuosa de proteína clarificada se bombea por la línea 132, a través de membranas de ultrafiltración 134 del tamaño para proporcionar el grado de concentración deseado de la solución acuosa de proteína para producir una solución de proteína concentrada como la retenida en la línea 136 con el permeado que se recupera por la línea 138. La solución de proteína concentrada se pasa en la entrada de un árbol de mezcla 140, con agua fría que se alimenta a esta por la línea 142 en un volumen suficiente para lograr el grado deseado de dilución. La solución resultante se alimenta por la línea 144 a un tanque de sedimentación 146 para permitir que la masa micelar de proteína se sedimente. La masa micelar de la proteína sedimentada en el recipiente de sedimentación 146, se retira por la línea 148 de vez en cuando y se pasa a través de un secador por atomización 150, para proporcionar el aislado de proteína de canola seco 152.

- 40 El sobrenadante a partir del tanque de sedimentación se retira por la línea 154 y se bombea a través de las membranas de ultrafiltración 152 para producir una solución de proteína concentrada como el retenido en la línea 158 con el permeado siendo retirado por la línea 160. La solución de proteína concentrada se pasa a través de un secador por atomización 162, para proporcionar otro aislado de proteína de canola seco 164.

- 45 Como alternativa, la solución de proteína concentrada en la línea 158 se puede pasar por la línea 166 para mezclar con la masa micelar de proteína antes de la mezcla, luego se seca en el secador por atomización 150.

EJEMPLOS**Ejemplo 1:**

Este Ejemplo ilustra el procedimiento adoptado para proporcionar los aislados de proteína de canola de la invención.

- 50 "a" kg de harina de canola comercial se adicionaron a "b" L de solución de NaCl 0.15 M a temperatura ambiente, se agitaron durante 30 minutos para proporcionar una solución acuosa de proteína que tiene un contenido de proteína de "c" g/L. La harina residual de canola se retiró y lavó en un cinturón de filtro de vacío. La solución de proteína

resultante fue clarificada por centrifugación para producir “d” L de una solución de proteína clarificada que tiene un contenido de proteína de “e” g/L.

5 Una “f” L alícuota de la solución del extracto de la proteína fue reducida en un volumen a “g” L, mediante la concentración en un sistema de ultrafiltración utilizando membranas de corte de peso molecular de “h” daltons. La solución de proteína concentrada resultante tuvo un contenido de proteína de “i” g/L.

10 La solución concentrada a “j” °C fue diluida “k” en agua a 4°C. Una nube blanca se formó inmediatamente y se dejó sedimentar. El agua de dilución superior fue retirada y la masa (PMM) precipitada, viscosa, pegajosa se recuperó del fondo del recipiente en un rendimiento de “1” % en peso de la proteína extraída. Se encontró que la proteína derivada de PMM seca tiene un contenido de proteína de “m” % (N x 6.25) d.b. (los valores de porcentajes de nitrógeno se determinaron utilizando un Leco FP528 Nitrogen Determinator). El producto recibió la designación “n”.

Los parámetros “a” a “n” para cinco aislados de proteína de canola derivados de PMM, se proporcionan en la Tabla I a continuación:

TABLA I

n	BW-AL017- B14-02A-C300	BW-AL017- B20-02A-C300	BW-AL017-D29-C300	BW-AL021-I24-02A-C300	BW-AL021-I30-02A-C300
a	150	150	150	150	150
b	1000	1000	1000	1000	1000
c	22.0	22.6	20.2	29.3	30.0
d	1000	1040	1040	1080	1080
e	15.4	15.3	14.6	20.8	19.2
f	600	500	1040	1080	1080
g	18	17	44	47.5	48.0
h	3000	3000	5000	5000	5000
i	289	236	225	311	218
j	31	32	30	24	19
k	1:15	1:15	1:15	1:15	1:15
l	19	22	29	35	20
m	105.8	102.9	103.2	105.4	103.0

15 El agua de dilución retirada fue reducida en volumen por ultrafiltración, utilizando una membrana de corte de peso molecular “o” dalton a una concentración de la proteína de “p’ g/L. El concentrado se secó. Con la proteína adicional recuperada a partir del sobrenadante, la recuperación de la proteína total fue “q” % en peso. La proteína seca que se formó tuvo un contenido de proteína de “r” % en peso (N x 6.25) d.b.

20 El producto recibió la designación “s”. Los parámetros “o” a “s” para cinco aislados de proteína de canola derivados del sobrenadante se proporcionan en la siguiente Tabla II

TABLA II

s	BW-AL017- B14-02A-C200	BW-AL017- B20-02A-C200	BW-AL017-D29-C200	BW-AL021- I24-02A-C200	BW-AL021- I30-02A-C200
o	3000	3000	5000	5000	5000
p	60.8	57.8	121.8	78.0	68.1
q	31.0	33.0	45	49	33
r	97.8	103.6	100.8	103.7	97.8

Ejemplo 2:

5 Este Ejemplo ilustra el análisis de los aislados de proteína de canola derivados del sobrenadante y derivados de la PMM del Ejemplo 1.

10 Un separador de proteína Gradi-Frac (Pharmacia Amersham) que tiene una columna de 100 cm y medio Sephacryl 300 HR (Sephacryl 300 HR es un polímero dextran, reticulado con metileno bis-acrilamida que permite el fraccionamiento de las proteínas globulares con un tamaño de 10,000 a 1,500,000 daltons) se corrió con una serie de estándares de origen de proteínas para determinar el tiempo de retención (RT) de cada componente, según se mide a A280 nm, a una velocidad de flujo de elución de 1.0 mL/min. La solución salina, con pH ajustado y que contiene azida sódica como un agente antibacteriano, fue utilizada como el solvente de columna. El eluyente fue recolectado en tubos de ensayo en un bastidor de automuestreador con cada tubo de ensayo con capacidad de 5 mL de líquido. Las fracciones de proteínas relativas fueron calculadas por área de pico, que se obtiene al multiplicar la base media por la altura del pico máxima.

15 Una columna analítica Varian para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna 300 x 7.8 mm BioSep S3000 para Cromatografía de Exclusión por tamaño (SEC) que contiene medio de soporte rígido de sílica ligada hidrofílica, diámetro de 5 micras, tamaño de poro 290-Angstrom, capaz de separar las proteínas globulares de un tamaño de 5,000 a 700,000 daltons, se corrió utilizando los mismos estándares de proteínas BioRad como con el sistema Gradi-Frac. Las proteínas BioRad cubren un rango de 17,000 daltons (mioglobulina) a 670,000 daltons (tioglobulina) con Vitamina B12 adicionada como un marcador de baja masa molecular a 1,350 daltons. Cada componente se mide a 280 nm a una velocidad de flujo de elución de 1.0 mL/min. La solución salina, con pH ajustado y que contiene azida sódica como un agente antibacteriano, fue utilizada como el solvente de columna y para disolver las muestras secas. El eluyente fue descartado después de la detección UV, no más de 50 microlitros de la muestra son necesarios por corrida. El sistema HPLC Prostar calculó automáticamente los tiempos de retención y el área de los picos y se imprime un informe de resumen.

20 Las muestras de los aislados de proteína de canola derivados del sobrenadante y los derivados de la PMM, preparados como se describe en el Ejemplo 1, para los lotes BW-AL-017-B14-02A-C300 y BW-AL017-B20-02A-C300, fueron corridas en cada columna. Los recuentos del área de pico se convirtieron a porcentaje para cada pico. Todos los picos en las diferentes corridas se tomaron en el cálculo y luego las tres principales fracciones de proteína, 12S, 7S y 2S, fueron recalculadas por separado.

25 Además, las curvas estándar, derivadas del estándar BioRad, fueron utilizadas para calcular los pesos moleculares aproximados para las tres fracciones de proteína, 12S, 7S y 2S, para las corridas hechas utilizando tanto GPC como HPLC. El sistema Gradi-Frac contiene más variabilidad que el sistema HPLC que resulta del tamaño de muestra más grande (1 mililitro versus 25 microlitros) y del diámetro de la columna, el cálculo manual de los resultados de Gradi-Frac y las diferencias del tiempo de corrida (25 minutos para el HPLC versus 5 horas para el Gradi-Frac). Además, el sistema Gradi-Frac utiliza el volumen como la determinación de la retención de la proteína mientras que HPLC utiliza el tiempo.

30 La variación en los datos mostrados en las Tablas III y IV a continuación, refleja las diferencias indicadas anteriormente. El sistema HPLC estadísticamente es mejor (menor variabilidad) que el sistema Gradi-Frac. El sistema Gradi-Frac tiene la ventaja de proporcionar fracciones de muestras individuales que además pueden ser analizadas (por ejemplo, utilizando espectrometría de masas), a diferencia del sistema HPLC.

Los resultados obtenidos se publican en la siguiente Tabla III, para el aislado de proteína de canola derivado de PMM (CPI) y la Tabla IV para el aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante (CPI):

TABLA III

			CPI Derivado de PMM			Proporciones de Proteína de HPLC-GPC							
HPLC-SEC													
Proteína			Fracciones de Proteína:			% de todos los Picos			2,7,12S	Otros	Pesos Moleculares Calculados		
			% 12S	% 7S	% 2S	% 12S	% 7S	% 2S	% de todos los Picos	% de todos los Picos	en kilo-Daltons		
Tipo:	Harina:	# de corrida:									12S	7S	2S
PMM	AL017	814	6%	94%	0.1%	6%	92%	0%	98%	2%	341	147	12.1
PMM	AL017	B20	6%	94%	0.1%	6%	92%	0%	98%	2%	342	146	11.5
		Media	6%	94%	0%	6%	92%	0%	98%	2%	342	146	11.8
		s.d.	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1	1	0.4
Gradi-Frac GPC													
Proteína			Fracciones de Proteína:			% de todos los Picos			2,7,12S	Otros	Pesos Moleculares Calculados		
			% 12S	% 7S	% 2S	% 12S	% 7S	% 2S	% de todos los Picos	% de todos los Picos	en kilo-Daltons		
Tipo:	Harina:	# de corrida:									12S	7S	2S
PMM	AL017	B14	8%	82%	9%	8%	82%	9%	99%	1%	354	152.	8.7
PMM	AL017	B20	9%	89%	2%	9%	88%	2%	99%	1%	403	163	8.6
		Media	9%	86%	6%	8%	85%	6%	99%	1%	378	158	8.6
		s.d.	0%	5%	5%	0%	5%	5%	0%	0%	35	8	0.0
Cálculos de Peso Molecular basados en Estándares de BioRad GPC que contienen proteínas de origen animal.													

TABLA IV

			CPI derivada de sobrenadante			Proporciones de Proteína de HPLC GPC							
HPLC-SEC													
Proteína			Fracciones de Proteína:			% de todos los Picos			2,7,12S	Otros	Pesos Moleculares Calculados		
			% 12S	% 7S	% 2S	% 12S	% 7S	% 2S	% de todos los Picos	% de todos los Picos	en kilo-Daltons		
Tipo:	Harina:	# de corrida:									12S	7S	2S
Sobrenadante	AL017	B14	0%	25%	75%	0%	25%	75%	99%	1%	ninguno	126	13.9
Sobrenadante	AL017	B20	0%	24%	76%	0%	24%	76%	99%	1%	ninguno	135	15.2
		Media	0%	24%	76%	0%	24%	75%	99%	1%		130	14.5
		s.d	0%	1%	1%	0%	1%	1%	0%	0%		6	1.0
Gradi-Frac GPC													
Proteína			Fracciones de Proteína:			% de todos los Picos			2,7,12S	Otros	Pesos Moleculares Calculados		
			% 12S	% 7S	% 2S	% 12S	% 7S	% 2S	% de todos los Picos	% de todos los Picos	en kilo-Daltons		
Tipo:	Harina:	# de corrida:									12S	7S	2S
Sobrenadante	AL017	B14	0%	37%	63%	0%	29%	50%	79%	21%	ninguno	147 152	10.6
Sobrenadante	AL017	B20	0%	37%	63%	0%	27%	46%	73%	27%	ninguno		11.0
		Media	0%	37%	63%	0%	28%	48%	76%	24%		150	10.8
		s.d.	0%	0%	0%	0%	1%	3%	4%	4%		4	0.3
Cálculos de Peso Molecular basados en Estándares de BioRad GPC que contienen proteínas de origen animal.													

Como se puede observar a partir de los datos presentados en la Tabla III, las muestras derivadas de PMM contenían una gran cantidad de la proteína 7S con menores porcentajes de las proteínas 2S y 12S.

Como se puede observar a partir de la Tabla IV, la proteína 12S es sustancialmente ausente a partir del aislado de proteína de canola derivado del sobrenadante mientras que la proteína predominante fue la proteína 2S, con cantidades de la proteína 7S están presentes.

5 Los pesos moleculares calculados para las corridas de HPLC fueron inferiores para las proteínas 12S y 7S pero más alta para la proteína 2S. Esta discrepancia aparente se puede deber, en parte, a dificultades en precisar exactamente los picos máximos para las corridas de GPC, que fueron hechas a mano.

10 El peso calculado por GPC de 385,000 dalton para 12S es superior que el reportado en la literatura para la cruciferina de la canola, que oscila de 300,000 a 310,000 da. Los pesos moleculares calculados por GPC y HPLC para 7S son similares y cerca al valor reportado de aproximadamente 150,000 da. El HPLC estimado para 2S es superior que el GPC medio y ambos menores que el valor reportado para napina de 14,000 da.

15 Como se puede observar a partir de los datos anteriores, el aislado de proteína de canola derivado de PMM en las muestras probadas contiene la fracción 7S en cantidades que fluctúan de 82 a 89% (por GPC) y 94% (por HPLC). Como se menciona anteriormente, el procedimiento de HPLC es más rápido y se considera que es más exacto que GPC. Basándose en las áreas de las fracciones de tres proteínas, se considera que las muestras derivadas de PMM contienen:

aproximadamente 88 a aproximadamente 98% en peso de la proteína 7S

aproximadamente 1 a aproximadamente 10% en peso de la proteína 12S

0 a aproximadamente 6% en peso de la proteína 2S

20 Del mismo modo, para las muestras derivadas del sobrenadante, basándose en las áreas de las fracciones de tres proteínas, se considera que estas muestras contienen:

aproximadamente 70 a aproximadamente 95% en peso de la proteína 2S

aproximadamente 5 a aproximadamente 30% en peso de la proteína 7S

0 a aproximadamente 2% en peso de la proteína 12S

25 El término "Fracción de Proteína" como se utiliza anteriormente, se define como el área de un pico en el Tiempo de Retención de HPLC (o GPC) que genera los pesos moleculares calculados en los rangos discutidos anteriormente, de acuerdo con estándares de proteínas de GPC/HPLC aceptables, tales como los disponibles de BioRad. Estos picos pueden contener otros componentes, pero mientras que caigan en un rango aceptable de los pesos moleculares diana, su presencia sería irrelevante.

30 Un objetivo aceptable de los pesos moleculares, basándose en la información contenida en este Ejemplo, parece ser:

12S : 300,000 a 360,000 da

7S : 125,000 a 160,000 da

2S : 9,000 a 15,000 da

Ejemplo 3:

35 Este Ejemplo muestra los efectos de ciertos parámetros en la extracción de la proteína.

En un primer conjunto de experimentos, 50 g de muestras de harina de semillas oleosas de canola tostada a baja temperatura (Harina LT) a 100°C para retirar el solvente residual fueron adicionados a 500 mL de muestras de solución de NaCl 0.05 M o 0.10 M a temperatura ambiente (20°C) y se agitan durante 15 minutos. La lechada se centrifugó a 5000 xg por 10 minutos para extraer y agotar la harina.

40 En un segundo conjunto de experimentos, 500 mL de agua sin adición de sal, en primer lugar fue calentada a 60°C en una placa de agitación con calor y a continuación, fueron adicionados 50 g de harina de semillas oleosas de canola que ha sido tostada a baja temperatura a 100°C para retirar el solvente residual y se agitan durante 15 minutos mientras que la temperatura se conserva. El extracto se separó a partir de la harina agotada por centrifugación a 5000 xg durante 10 minutos.

Las concentraciones de la proteína de las diferentes soluciones de proteína acuosas obtenidas en estos experimentos se determinaron y aparecen en la siguiente Tabla V:

TABLA V Concentraciones de Proteína en Extractos (% en peso)

	solución salina 0.05 M	solución salina 0.10 M	agua 60°C
Harina LT	1:11	1.44	0.98

- 5 La capacidad de extracción de la proteína a partir de las harinas se determinó de los datos de la concentración de la proteína de la Tabla V y estos datos se presentan en la Tabla VI:

TABLA VI Capacidad de extracción de la proteína (% en peso)*

	solución salina 0.05 M	solución salina 0.10 M	agua 60°C
Harina LT	28.6	37.4	25.5
* Se define como el porcentaje de la cantidad de la proteína extraída de la cantidad de la proteína total en la harina.			

- 10 Las muestras de extractos preparados como se describe en este Ejemplo fueron corridos en cada una de las columnas de HPLC y SEC descritas en el Ejemplo 2. Los recuentos del área de pico se convirtieron a porcentaje para cada pico. Todos los picos en las diferentes corridas se tomaron en el cálculo y luego las fracciones de las tres principales proteínas, 12S, 7S y 2S, fueron recalculadas por separado. Los resultados obtenidos se muestran en los datos gráficos de las Figuras 2 a 4.

- 15 Cada cromatograma mostró un pico distinto que representa la fracción de la proteína de canola 7S y una pequeña protuberancia de la fracción de la proteína de canola 12S. El pico para la fracción de la proteína de canola 2S estuvo presente entre los picos para otros componentes del extracto. Los picos en el extremo del peso molecular inferior del cromatograma no fueron identificados correctamente, pero probablemente corresponden a compuestos nitrogenados sin proteína, tales como péptidos cortos y aminoácidos libres, así como otros componentes de harina, tales como compuestos fenólicos, glucosinolatos y fitatos.

20 **Ejemplo 4:**

Este Ejemplo ilustra el análisis de muestras del aislado de proteína de canola.

- 25 La cromatografía de permeación en gel como se describe en el Ejemplo 2, se llevó a cabo en muestras de aislado de proteína de canola secado por atomización a partir de lotes BW-AL017-D29-C200 y BW-AL017-D29-C300, preparados como se describe en el Ejemplo 1, que produjeron cuatro fracciones de proteína que fueron etiquetadas 2S, >2S, 7S y 12S, con la 2S y posiblemente fracciones >2S que representan albúminas pequeñas, solubles en agua y las proteínas 7S y 12S que representan las globulinas más hidrofóbicas, menos-solubles en agua.

Estas fracciones y muestras tratadas con ácido suave fueron analizadas por espectroscopía de masas MALDI y produjeron los siguientes resultados:

Fracción 2S:

- 30 El análisis utilizando MALDI-MS indicó una masa molecular de cerca de 14,000 daltons. Un pico de banda estrecha se observó con la parte superior del pico bifurcado, con el pico principal que cae entre 13,960 da y 14,250 da, una diferencia de 2 a 3 aminoácidos, que podría ser la indicación de isozimas de diferentes proteínas.

- 35 El tratamiento con ácido de la fracción de 2S en ácido acético 5% durante 24 horas no revelaron ninguna especie de polipéptido más pequeña a un corte de límite bajo de 8,000 da, indicando una resistencia de la proteína 2S a acidificación suave.

Fracción >2S:

Los barridos MS de este material indicaron un pico pequeño a aproximadamente 13,950 a 13,990 da, atribuible a la proteína 2S, y un pico principal a 13,380 a 13,410 da, de origen desconocido. La fracción también contenía un pico significativo pero menos intenso entre 17,160 y 17,260 da, también de origen desconocido.

- 5 El tratamiento con ácido débil de la última fracción con ácido acético al 5% durante 24 horas redujo solo el pico principal a 13,400 da, con alguno de los componentes menores que aparece a aproximadamente 7,000 a 8,000 da, posiblemente productos de hidrólisis. El pico de 2S no parece disminuido.

Fracción 7S:

- 10 Los barridos de MS de este material mostraron que el pico más significativo ocurre entre 48,150 y 49,950 da con el pico principal a aproximadamente 48,400 +/-100 da. Un pico mucho menos intenso y más amplio apareció con dos picos a aproximadamente 95,940 da y 97,510 da respectivamente, lo que indica la presencia de una pequeña cantidad de la proteína que contiene dos subunidades. Los análisis realizados en el Ejemplo 2 sugieren una masa molecular de aproximadamente 150,000 da, para la proteína 7S mientras que el análisis MALDI en este documento indica una masa molecular ligeramente inferior de aproximadamente 145,000 da.

- 15 Un menor componente apareció a 13,420 da, en el área del pico principal de la fracción >2S, pero no a 14,000 da. Un triplete principal del pico apareció entre 16,975 y 17,905 da. Estos picos probablemente son atribuibles a un polipéptido principal en la subunidad de proteína y también estuvo presente en la fracción >2S pero no la fracción 2S.

- 20 El tratamiento con ácido de la fracción 7S con ácido acético al 1%, durante 24 horas deja la especie principal intacta a 48,310-da con un pico más pequeño a 45,750 da (pérdida posible de un polipéptido pequeño). Nuevos picos aparecieron a 16,310 da, 22,710 da y 24,070 da y probablemente representen productos de hidrólisis.

Otro tratamiento con ácido de la fracción 7S, se realizó utilizando 20% de ácido fórmico. Los barridos se tomaron después de una hora de tratamiento y de nuevo después de tres días de exposición al ácido fórmico.

- 25 Una nueva especie apareció a aproximadamente 26,300 da después de una hora de exposición y los otros picos fueron aproximadamente donde se indica para el tratamiento con ácido acético al 5%. La exposición para tres días conduce a una caída en la intensidad del pico para la principal subunidad (48,260 da) con un aumento en los picos principales a 16,315 da y 17,850 da.

Los barridos por debajo de 9,000 da, revelaron un patrón característico de seis picos a 4,490 da, 5,720 da, 6,530 da, 7,030 da y 7,330 da, aunque el pico a 4,490 da, aumentó significativamente en el tercer día.

Fracción 12S:

- 30 El análisis MALDI-MS de la Fracción 12S produjo un pico principal centrado entre 48,150 y 48,200 da, representando la subunidad de proteína principal. El principal pico de campo bajo ocurrió a 94,960 da con otros picos más pequeños a 64,620 da, 77,540 da, 126,990 da y 143,280 da. Los picos de masa molecular grande no fueron bien definidos y pueden solo aproximar las masas moleculares verdaderas. El pico principal de campo bajo está cerca a dos veces la subunidad de masa molecular mientras que el pico amplio a 143,280 da está cerca a tres veces la masa de subunidad.

Otros picos significantes aparecen a aproximadamente 13,400 da, 16,400 da, 17,900 da y 29,000 a 29,700 da, los cuales son probablemente algunos de los polipéptidos que componen las subunidades de proteínas.

- 40 El tratamiento con ácido de la fracción 12S con ácido acético al 5%, durante 24 horas produjo un perfil casi idéntico al de la fracción 7S y se ha descrito anteriormente. El tratamiento con ácido fórmico al 20% después de tres días mostró una pérdida de la subunidad principal a 48,100 da y un aumento en la especie de 17,900 da.

Los barridos por debajo de 9,000 da, fueron casi idénticos a la hidrólisis de 7S después de una hora en ácido fórmico al 20%, con seis picos principales a 4,480 da, 5,730 da, 6,510 da, 6,650 da, 7,020 da y 7,310 da. El pico a 4,480 da no aumentó significativamente en el tercer día del tratamiento con ácido fórmico a diferencia de los resultados para la fracción 7S.

- 45 Teniendo en cuenta los resultados del análisis MALDI-MS informado en este Ejemplo, se puede concluir que:

(a) la proteína 2S tiene una masa molecular entre 13,960 y 14,250 da, en la línea con los resultados publicados de cerca de los 14,000 da y es muy resistente al tratamiento con ácido suave.

(b) Las proteínas 7S y 12S se componen de los mismas unidades estructurales con una subunidad básica en el rango 48,200 a 48,400 da. La proteína 7S tiene una masa molecular de tres subunidades o aproximadamente 145,000 da y la proteína 12S contiene 6 subunidades con una masa molecular combinada de aproximadamente 290,000 da. Estos valores son inferiores que aquellos obtenidos por los cálculos de masa molecular GPL y HPLC SEC en el Ejemplo 2, pero aquellos resultados se basan en estándares de origen animal.

(c) La hidrólisis ácida de las proteínas 7S y 12S no producen la proteína 2S.

(d) La hidrólisis ácida de las dos proteínas globulares dieron resultados casi idénticos, confirmando que las dos proteínas fueron obtenidas a partir de la misma subunidad.

Ejemplo 5:

Este Ejemplo ilustra la cromatografía líquida de alta resolución preparativa (HPLC).

Un sistema de cromatografía líquida de alta resolución Varian Preparativa (prep-HPLC), utilizando una columna principal 300 x 21.20 mm Phenomenex BioSep S30000 de Cromatografía de Exclusión por tamaño (SEC), que contiene medio de soporte rígido de silica ligada hidrofílica, diámetro de 5 micras, tamaño de poro de 290-Angstrom, fue utilizada para el fraccionamiento de las proteínas de canola. Una pre-columna desechable, que contiene el mismo envase y con un tamaño de 60 x 21.20 mm, se adjuntó por delante de la columna principal.

Cada analito fue monitoreado a 280 nm a una velocidad de elución entre 6 mL/minuto y 8 mL/minuto. El límite de presión superior de 1,000 psi en la columna no se superó a estas velocidades de flujo. La solución salina, que contiene azida sódica como un agente antibacteriano, fue utilizada como la fase móvil de la columna y también fue utilizada para disolver las muestras de proteína de canola secas. El eluyente fue recolectado en un Recolector de fracciones Varian Model 701. Los tiempos de corrida oscilan de 12 minutos a 15 minutos en función de la muestra.

El volumen de inyección de la muestra fue entre 1.0 y 1.5 mL, para una concentración de la muestra entre 2.0% y 3.0% por peso seco del aislado de proteína, o 20 mg a 45 mg de sólidos por inyección. La capacidad de la columna se puede sobrepasar más allá de 1.5 mL, dependiendo del tipo de muestra y la concentración. Las preparaciones de la muestra se agitaron durante un mínimo de 30 minutos antes de la centrifugación a 10,000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante luego fue filtrado al vacío a través de un mínimo de un disco de membrana de 0.45-micrones.

Aunque el sistema se puede correr continuamente durante un periodo de 24 horas, esto no se hizo usualmente, como un procedimiento de limpieza, involucrando acetonitrilo en agua, fue necesario diariamente para retirar las impurezas de la columna. Aún así, por lo general se pueden hacer 80 a 100 corridas cada día, con entre 0.5 y 1.2 gramos de analito recolectado.

Las muestras se prepararon a partir de aislados de proteína de canola derivados del sobrenadante y derivados de la PMM, incluyendo los siguientes: BW-AL-017-D29-02A-C200, BW-AL021-I24-02A-C200, BW-AL021-I30-02A-C200, BW-AL-017-D29-02AC300, BW-AL021-I24-02A-C300 y BW-AL021-I30-02A-C300, preparados como se describe en el Ejemplo 1.

Las muestras de PMM (C300) fueron utilizadas para la recolección de las proteínas 7S y 12S, mientras que las muestras derivadas del sobrenadante (C200) se utilizaron principalmente para recolectar 2S. Las alícuotas de la fracción se probaron en el Varian Analytical SEC-HPLC para la pureza. Los niveles de proteína eluyente, por lo general fueron menos de 0.3% en peso (N x 6.25) o menos de 2.0 Unidades de Absorbancia a 280 nm, y el contenido de sal normalmente fue entre 0.5% en peso y 0.7% en peso de NaCl según se determina por conductividad.

Ejemplo 6:

Este Ejemplo ilustra la ultrafiltración y la diálisis de las fracciones recolectadas en el Ejemplo 5.

La ultra-filtración, seguida por la diálisis, ambas se realizan para reducir el gran volumen de eluyente y la alta relación sal a proteína. El eluyente diluido del sistema HPLC Preparativo Varian descrito en el Ejemplo 5, fue concentrado en dos unidades de célula agitada Ultra-filtración Amicon Series 8000, cada una con una capacidad máxima evaluada de 400 mL de volumen.

Cada unidad fue equipada con una membrana de 76 mm de diámetro con corte de tamaño molecular selectivo. Para la proteína 2S, las membranas utilizadas incluyen: disco Ultracel Amicon YM1 UF con celulosa regenerada, 1,000 NMWL (Límite de Peso Molecular Nominal), #13342, y discos Ultracel Amicon YM10 UF de celulosa regenerada, 10,000 NMWL, #13642.

Para las proteínas globulares 7S y 12S más grandes, las membranas NMWL mayores fueron utilizadas: discos Biomax PBQK UF de polietileno sulfona (PES), 50,000 NMWL, #PBQK 07610, o discos Biomax PBHK UF de PES, 100,000 NMWL, #PBHK 07610.

5 Las membranas NMWL mayores produjeron ligeras pérdidas en la retención de la proteína, denominadas Retentate, pero también retiraron las impurezas de peso molecular más bajo, que se asocian débilmente con la proteína. Los cortes de NMWL superiores también reducen los tiempos de operación de UF. Los tiempos de corrida típicos para 1,200 ml de muestra de HPLC en las dos unidades UF fueron 4 a 5 horas.

10 En una corrida típica, la muestra se adicionó a la línea de 325 mL en cada unidad. Con agitación, los niveles aumentan a aproximadamente 375 mL. Las unidades fueron selladas y se aplicó presión a 60 psi, mientras que las muestras se agitaron. Cuando la Retentate dentro de las unidades cae a aproximadamente 100 mL, la presión fue liberada y la muestra adicional se adicionó a cada unidad. Este proceso continuo hasta que la muestra total se adicionó. La Retentate final fue concentrada entre 75 mL y 100 mL dentro de cada celda.

15 El eluente, llamado el Permeado, fue retirado de cada unidad y se mide la salinidad por conductividad, y el contenido de proteína relativo mediante la absorbancia a 280 nm, utilizando una celda de 1-cm en un Espectrofotómetro UV-Visible UltraSpec 1000E. Un balance de masa se calculó para proporcionar la información en la eficiencia de las membranas UF. Las muestras de Permeado UF y Retentate final se probaron por SEC-HPLC analítica, como se describe en el Ejemplo 2, para pureza.

20 La Retentate de ultra-Filtración fue vertida en membranas de Diálisis Spectra/Por 7, 1,000 MWCO (Corte de Peso Molecular), diámetro de 24.2 mm, #132104. Cada pieza de la tubería se cortó a aproximadamente 300 mm. Las membranas rellenas, luego fueron colocadas en botellas de 4 litros selladas que contienen agua RO. El agua RO fue reemplazada dos veces antes de las muestras dializadas fueron retiradas a partir de los tubos y se colocaron en moldes para la congelación a -65°C. Las salinidades por lo general fueron por debajo de 0.1% en peso, basándose en la conductividad.

25 Las muestras congeladas luego fueron colocadas en el Secador por Congelación Virtis SRCX-15. Los tiempos de secado fueron variables, dependiendo de la carga de agua. Las muestras secas fueron retiradas de los moldes y se pesaron antes de la distribución del análisis.

Ejemplo 7:

Este Ejemplo ilustra el análisis de aminoácidos.

30 Las proteínas de canola 2S, 7S y 12S ultra-filtradas, dializadas y liofilizadas individuales, preparadas como se describe en los Ejemplos 5 y 6, han sido analizadas por el contenido de aminoácido. La muestra de 2S fue derivada a partir del aislado de proteína de canola AL021-I30-02A C200 mientras que las proteínas 7S y 12S fueron derivadas a partir del aislado de proteína de canola AL017-D29-02A C300.

El análisis de aminoácidos se publica en la siguiente Tabla VII:

TABLA VII

g/100 g de materia seca				
Aminoácido MW(1)	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
133.1	Ácido aspártico	3.18	11.60	3.02
119.1	Treonina	2.70	3.34	1.00
105.1	Serina	3.84	4.52	1.23
204.2	Triptófano	1.16	1.42	0.40
146.1	Ácido glutámico	25.10	21.50	5.91

(continuación)

g/100 g de materia seca				
Aminoácido MW(1)	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
75.1	Glicina	3.91	5.44	1.45
89.1	Alanina	3.67	4.47	1.18
121.1	Cistina	4.13	1.19	0.34
117.1	Valina	4.02	5.92	1.55
149.2	Metionina	2.55	1.74	0.41
131.2	Isoleucina	2.89	5.12	1.31
131.2	Leucina	6.13	8.70	2.31
181.2	Tirosina	1.14	2.67	0.70
165.2	Fenilalanina	2.43	5.01	1.28
155.2	Histidina	2.58	1.60	0.46
146.2	Lisina	5.92	3.17	0.88
174.2	Arginina	5.99	8.02	2.13
115.1	Prolina	9.02	5.83	1.68
	Suma:	90.36	101.26	27.24
	MW Medio de aa (1)	134.61	134.86	134.77
	MW Anhidro (2)	116.59	116.85	116.75
Nota: (1): Peso Molecular de aminoácidos " libre". (2): Peso Molecular Medio del Peso de aminoácidos poliméricos.				

5 Los valores presentados en la Tabla VII representan los aminoácidos en la base de gramos por 100 gramos de peso seco. La muestra 12S contenía sal residual, incluso después de la ultrafiltración, lo que representa el peso del aminoácido total bajo en las muestras en comparación con las muestras 7S y 2S. Los datos se ajustaron con la base de 100 gramos del aminoácido y los datos revisados se muestran en la siguiente Tabla VIII:

TABLA VIII

Resumen de Aminoácidos: g/100g de Aminoácidos				
Hidrofobicidad: Gibbs: kJ/100g:	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
-	Ácido aspártico*	3.5	11.5	11.1

(continuación)

Resumen de Aminoácidos: g/100g de Aminoácidos				
Hidrofobicidad: Gibbs: kJ/100g:	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
1.40	Treonina ^e	3.0	3.3	3.7
-	Serina	4.2	4.5	4.5
6.96	Triptófano ^e	1.3	1.4	1.5
-	Ácido glutámico*	27.8	21.2	21.7
-	Glicina	43	5.4	5.3
2.35	Alanina	4.1	4.4	4.3
3.45	Cistina ^e	4.6	1.2	1.2
5.35	Valina ^e	4.4	5.8	5.7
3.64	Metionina ^e	2.8	1.7	1.5
9.56	Isoleucina ^e	3.2	5.1	4.8
7.32	Leucina ^e	6.8	8.6	8.5
5.30	Tirosina	1.3	2.6	2.6
6.33	Fenilalanina ^e	2.7	4.9	4.7
1.35	Histidina ^e	2.9	1.6	1.7
-	Lisina ^e	6.6	3.1	3.2
-	Arginina ^e	6.6	7.9	7.8
9.44	Prolina	10.0	5.8	6.2
	Suma:	100.0	100.0	100.0
	Suma de aa esenciales:	44.8	44.7	44.3
	% de aa hidrófobos:	46.9	46.4	46.3
	Hidrofo. kJ/100g:	214.5	279.3	277.7
e = 11 aminoácidos esenciales aa = aminoácidos				
* Ácido glutámico y ácido aspártico principalmente son amidados a glutamina y asparagina				

Como se puede observar a partir de la Tabla VIII, la proteína 2S de albúmina difiere de las proteínas globulares 7S y 12S, en niveles relativos de los aminoácidos diferentes. Las principales diferencias surgen del Ácido aspártico, Ácido glutámico, Cisteína, Lisina y Prolina, aunque las diferencias también son aparentes para la mayoría de los aminoácidos enumerados. En comparación, los perfiles de 7S y 12S son casi idénticos, y ciertamente caerían dentro de la variación estándar para esta prueba. Las cantidades del ácido glutámico también incluyen glutamina, y el ácido aspártico incluye Asparagina. Ambas Glutamina y Asparagina se desaminaron durante la hidrólisis ácida, lo que lleva a la detección del análisis de aminoácido.

La Tabla VII incluye los pesos moleculares para los aminoácidos individuales. Combinados con las cantidades individuales, los pesos moleculares medios para los aminoácidos "libres" para 2S, 7S y 12S se muestran, y son todos un poco menos de 135-da. Los Pesos Moleculares Promedio del Peso anhidro también se muestran ya que las proteínas son biopolímeros de aminoácidos anhidros, (cada uno menos una molécula de agua, excluyendo un aminoácido terminal por polipéptido). A pesar de las diferencias entre los dos tipos de proteína, los pesos moleculares del aminoácido polimérico medio son casi idénticos a aproximadamente 117- da. Esto significa que 2S, con un peso molecular determinado MALDI-MS de 14-kDa, consiste de aproximadamente 120 aminoácidos, 7S, con un peso molecular MALDI-MS de 145-kDa, contendría aproximadamente 1,240 aminoácidos, y 12S contendría el doble de este número, o 2,480 aminoácidos. Cada subunidad de 7S/12S contendría aproximadamente. 413 aminoácidos.

La Tabla VIII también indica los aminoácidos esenciales, que no pueden ser sintetizados por humanos. El contenido total de los once aminoácidos esenciales es muy similar para los dos tipos de proteína. La debilidad en un aminoácido se equilibra por fuerzas en otros aminoácidos esenciales. Lisina se encontró en 2S a aproximadamente dos veces los niveles en 7S y 12S. Sin embargo, las proteínas globulares tienen niveles completos mayores en los aminoácidos esenciales aromáticos Tirosina y Fenilalanina, y por lo general son superiores en los aminoácidos esenciales hidrofóbicos alifáticos, con las excepciones de Metionina y Cisteína.

La hidrofobicidad de los aminoácidos en la Tabla VIII, se determina de acuerdo con valores de Energía Libre de Gibbs, expresados como KJ por 100 gramos de aminoácido. Los valores de Energía Libre de Gibbs se enumeran en Food Chemistry, 3rd ed., editado por Owen Fennema, Marcel Dekker, New York, 1996, p 330. Los dos tipos de la proteína no difieren sustancialmente en sus sumas de peso o sumas de energía para la hidrofobicidad, pero la hidrofobicidad también es dependiente de la orientación estructural de los polipéptidos y no solo la química de los aminoácidos individuales. En general, las proteínas globulares tienen un Punto Isoeléctrico cerca al pH neutro (7.2) mientras que 2S tiene un Punto Isoeléctrico por encima de pH 9.0 de acuerdo con la revisión de proteínas de colza por Mieth et al. (Tabla IX a continuación). 2S es muy pequeña en peso molecular, mientras que 7S y 12S son considerablemente más grandes con más regiones interiores potencialmente hidrofóbicas que resistirían la hidratación con agua.

La composición del aminoácido se puede convertir en residuos de aminoácidos mediante el uso de un estimado del número de residuos de aminoácidos en el biopolímero. Como se discute previamente, 2S contiene aproximadamente 120 residuos de aminoácidos, mientras que 7S contiene aproximadamente 1,240 y 12S aproximadamente 2,480 residuos, basándose en el análisis MALDI-MS.

La siguiente Tabla IX convierte los resultados del análisis de aminoácidos presentados anteriormente para los aminoácidos de 2S y compara los resultados con los rangos de residuos de aminoácidos publicados.

TABLA IX

Comparación de Residuos de Aminoácidos de 2S con Valores de Literatura				
Valores Basados en residuos de aminoácidos:				
Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	2S @ 120 aa:	2S Liter. Rango ¹ :	2S Liter. Rango ² :
Ácido aspártico*	3.4	4	2-5	2
Treonina ^e	3.2	4	3-4	4
Serina	5.2	6	4-7	6-7
Triptófano	0.8	1	1-2	1
Ácido glutámico*	24.6	29	27-32	29-34
Glicina	7.4	9	6-10	7-9
Alanina	5.9	7	6-7	6-8

(continuación)

Comparación de Residuos de Aminoácidos de 2S con Valores de Literatura				
Valores Basados en residuos de aminoácidos:				
Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	2S @ 120 aa:	2S Liter. Rango ¹ :	2S Liter. Rango ² :
Cistina ^e	4.9	6	8	7-8
Valina ^e	4.9	6	5-7	6-7
Metionina ^e	2.4	3	1-3	2-3
Isoleucina ^e	3.2	4	4-7	4
Leucina ^e	6.7	8	7-9	8-9
Tirosina	0.9	1	1-2	1
Fenilalanina ^e	2.1	3	3-5	2-3
Histidina ^e	2.4	3	3-4	3-4
Lisina ^e	5.8	7	5-9	6-9
Arginina ^e	4.9	6	5-8	4-6
Prolina	11.2	13	13-14	12-15
Suma:	100.0	120	114-136	110-133
e = 11 aminoácidos esenciales aa = aminoácidos Los datos de MALDI-MS indican que 2S tiene MW de aproximadamente 14,000-da, o 120 aminoácidos poliméricos * Ácido glutámico y ácido aspártico principalmente son amidados. ¹ Monsalve et al., J. Experimental Botany, Vol. 41, No. 222, pp. 89-94, January 1990. ² Mieth et al., Die Nahrung, 27, 7, 1983, pp. 675-697.				

5 Las conversiones concuerdan muy bien con los resultados publicados. Los trabajos más recientes por Monsalve et al. (1990, por Tabla IX), más el trabajo de Gehrig et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, pp. 3647-3652, April, 1996, y de Ericson et al., J. Biological Chem., Vol. 261, No. 31, pp. 14576-14581, Nov. 1986 proporcionan información detallada a cerca de 2S y la molécula precursor pro-Napin, incluyendo la secuenciación del aminoácido actual.

10 Los aminoácidos individuales caen dentro de los rangos de trabajos publicados indicados en la Tabla IX. Los rangos enumerados se deben a las variaciones dentro de las variedades de colza y también se puede deber a menores pérdidas hidrolíticas en el trabajo experimental reportado.

Aunque menos se publica sobre cruciferina (12S), lo que se conoce a cerca de las proteínas globulares de canola se encuentra de acuerdo con nuestros hallazgos corrientes. Los datos del análisis de aminoácidos se convirtieron a residuos de aminoácidos en la Tabla X y se compara con los rangos publicados para la proteína 12Ss.

15

TABLA X

Comparación de Residuos de Aminoácidos 7S/12S con Valores de Literatura					
Aminoácido	Burcon AL017-D29-02A 7S	Burcon AL017-D29-02A 12S	7S @ 1240 aa:	12S @ 2480 aa:	Revisión de Literatura Rango de residuos 12S ¹
Ácido aspártico*	11.09	10.73	137	266	235-270
Treonina	3.57	3.97	44	98	
Serina	5.47	5.53	68	137	
Triptófano	0.88	0.93	11	23	
Ácido glutámico*	18.72	19.12	232	474	434-531
Glicina	922	9.13	114	226	
Alanina	6.38	6.26	79	155	
Cistina	1.25	1.33	16	33	14-37
Valina	6.43	6.26	80	155	
Metionina	1.48	1.30	18	32	13-44
Isoleucina	4.96	4.72	62	117	
Leucina	8.44	8.32	105	206	
Tirosina	1.87	1.83	23	45	
Fenilalanina	3.86	3.66	48	91	
Histidina	1.31	1.40	16	35	45-47
Lisina	2.76	2.85	34	71	78-96
Arginina	5.86	5.78	73	143	83-143
Prolina	6.44	6.90	80	171	
Suma:	100.0	100.00	1240	2480	
El MW (anhidro) medio para 7S y 12S se calcula que es 116.8 daltons. Los resultados de MALDI=MS indican un MW de 145-kDa para 7S y 290-kDa para la proteína 12S (Ejemplo 4). Por consiguiente, 7S consistiría de aproximadamente 1,240 residuos de aminoácidos y 12S contendría el doble, o aproximadamente 2,480 residuos. ¹ Mieth et al., Die Nahrung, 27, 7, 1983, pp. 678-697.					

5 La información publicada proviene de la revisión de proteínas de colza por Mieth et al., 1983. Esta referencia enumera el rango de residuos de aminoácidos específicos. Los datos presentados en este documento, por lo general están en línea con estos rangos, como se muestra.

Los autores (Mieth et al.) se refieren a la molécula de 12S contiene 6 subunidades principales, cada una que consiste de dos polipéptidos con masas moleculares de aproximadamente 18,000-da y 31,000-da. Esta información también está en consonancia con lo que los datos de MALDI-MS presentados en el Ejemplo 4.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína 7S de canola que se aísla y purifica a partir de una masa micelar de proteína de canola.

2. La proteína de la reivindicación 1, que tiene un peso molecular, según se determina por MALDI-MS, de 145 kDa, preferiblemente compuesta de tres subunidades, cada una con un tamaño aproximado de 413 aminoácidos, que preferiblemente tiene un análisis de aminoácidos sustancialmente como se publica en las siguientes tablas:

5

TABLA VII

g/100 g de materia seca				
Aminoácido MW(1)	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
133.1	Ácido aspártico	3.18	11.60	3.02
119.1	Treonina	2.70	3.34	1.00
105.1	Serina	3.84	4.52	1.23
204.2	Triptófano	1.16	1.42	0.40
146.1	Ácido glutámico	25.10	21.50	5.91
75.1	Glicina	3.91	5.44	1.45
89.1	Alanina	3.67	4.47	1.18
121.1	Cistina	4.13	1.19	0.34
117.1	Valina	4.02	5.92	1.55
149.2	Metionina	2.55	1.74	0.41
131.2	Isoleucina	2.89	5.12	1.31
131.2	Leucina	6.13	8.70	2.31
181.2	Tirosina	1.14	2.67	0.70
165.2	Fenilalanina	2.43	5.01	1.28
155.2	Histidina	2.58	1.60	0.46
146.2	Lisina	5.92	3.17	0.88
174.2	Arginina	5.99	8.02	2.13
115.1	Prolina	9.02	5.83	1.68
	Suma:	90.36	101.26	27.24
	MW Medio de aa (1)	134.61	134.86	134.77
	MW Anhidro (2)	116.59	116.85	116.75
Nota: (1): Peso Molecular de aminoácidos " libre".				
(2): Peso Molecular Medio del Peso de aminoácidos poliméricos.				

TABLA VIII

Resumen de Aminoácidos: g/100g de Aminoácidos					
Hidrofobicidad: kJ/100g:	Gibbs:	Aminoácido	AL021-I30-02A 2S	AL017-D29-02A 7S	AL017-D29-02A 12S
-		Ácido aspártico*	3.5	11.5	11.1
1.40		Treonina ^e	3.0	3.3	3.7
-		Serina	4.2	4.5	4.5
6.96		Triptófano ^e	1.3	1.4	1.5
-		Ácido glutámico*	27.8	21.2	21.7
-		Glicina	4.3	5.4	5.3
2.35		Alanina	4.1	4.4	4.3
3.45		Cistina ^e	4.6	1.2	1.2
5.35		Valina ^e	4.4	5.8	5.7
3.64		Metionina ^e	2.8	1.7	1.5
9.56		Isoleucina ^e	3.2	5.1	4.8
7.32		Leucina ^e	6.8	8.6	8.5
5.30		Tirosina	1.3	2.6	2.6
6.33		Fenilalanina ^e	2.7	4.9	4.7
1.35		Histidina ^e	2.9	1.6	1.7
-		Lisina ^e	6.6	3.1	3.2
-		Arginina ^e	6.6	7.9	7.8
9.44		Prolina	10.0	5.8	6.2
		Suma:	100.0	100.0	100.0
		Suma aa esenciales:	44.8	44.7	44.3
		% de aa hidrófobos:	46.9	46.4	46.3
		Hidrofo. kJ/100g:	274.5	279.3	277.7
e = 11 aminoácidos esenciales aa = aminoácidos					
* Ácido glutámico y ácido aspártico principalmente son amidados a glutamina y asparagina					

3. La proteína reivindicada en la reivindicación 1 o 2, en donde dicha masa micelar de la proteína se forma por la dilución de una solución salina concentrada de la proteína de canola extraída a partir de harina de semillas oleosas de canola, bajo condiciones ligeramente ácidas.

4. Un método de aislamiento y purificación de una proteína de canola 7S a partir de un aislado de proteína de canola que contiene una mezcla de proteínas de canola y que muestra un perfil de proteínas de:

60 a 98 % en peso de proteína 7S,

1 a 15 % en peso de proteína 12S,

5 0 a 25 % en peso de proteína 2S, que comprende:

proporcionar dicho aislado de proteína de canola que tiene un contenido de proteína de al menos el 90 % en peso en base a peso seco y a una conversión de nitrógeno de Kjeldahl de N X 6.25,

solubilizar el aislado de proteína de canola,

10 someter la solución de proteína resultante a cromatografía líquida de alta resolución preparativa o a un procedimiento equivalente de separación de proteínas en función de su tamaño molecular,

recolectar las fracciones del eluyente que contienen la proteína de canola 7S,

someter las fracciones seleccionadas a ultrafiltración para reducir el volumen del eluyente,

dializar el eluyente concentrado para retirar el material solubilizante, y

secar el dializado para recuperar la proteína de canola 7S.

15 **5.** El método reivindicado en la reivindicación 4, en donde dicho aislado de proteína de canola es aquel que muestra un perfil de proteínas que tiene:

88 a 98 % en peso de la proteína 7S,

1 a 10 % en peso de la proteína 12S, y

0 a 6 % en peso de la proteína 2S.

20 **6.** El método reivindicado en la reivindicación 4 o 5, en donde dicho aislado de proteína de canola tiene un contenido de proteína de al menos el 100 % en peso.

7. Un método de aislamiento y purificación de una proteína de canola 2S, a partir de un aislado de proteína de canola que contiene una mezcla de proteínas de canola y que muestra un perfil de proteínas que tiene:

60 a 95 % en peso de la proteína 2S,

25 5 a 40 % en peso de la proteína 7S,

0 a 5 % en peso de la proteína 12S, que comprende:

proporcionar dicho aislado de proteína de canola que tiene un contenido de proteína de al menos el 90 % en peso en base a peso seco y a una conversión de nitrógeno de Kjeldahl de N X 6.25,

solubilizar el aislado de proteína de canola,

30 someter la solución de proteína resultante a cromatografía líquida de alta resolución preparativa o a un procedimiento equivalente de separación de proteínas en función de su tamaño molecular,

recolectar las fracciones del eluyente que contienen la proteína de canola 2S,

someter las fracciones seleccionadas a ultrafiltración para reducir el volumen del eluyente,

dializar el eluyente concentrado para retirar el material solubilizante, y

35 secar el dializado para recuperar la proteína de canola 2S.

8. El método reivindicado en la reivindicación 7, en donde dicho aislado de proteína de canola es aquel que muestra un perfil de proteínas que tiene:

70 a 95 % en peso de la proteína 2S,

5 a 30 % en peso de la proteína 7S, y

5 0 a 2 % en peso de la proteína 12S.

9. El método reivindicado en la reivindicación 7 u 8, en donde dicho aislado de proteína de canola tiene un contenido de proteína de al menos el 100 % en peso.

Figura 1

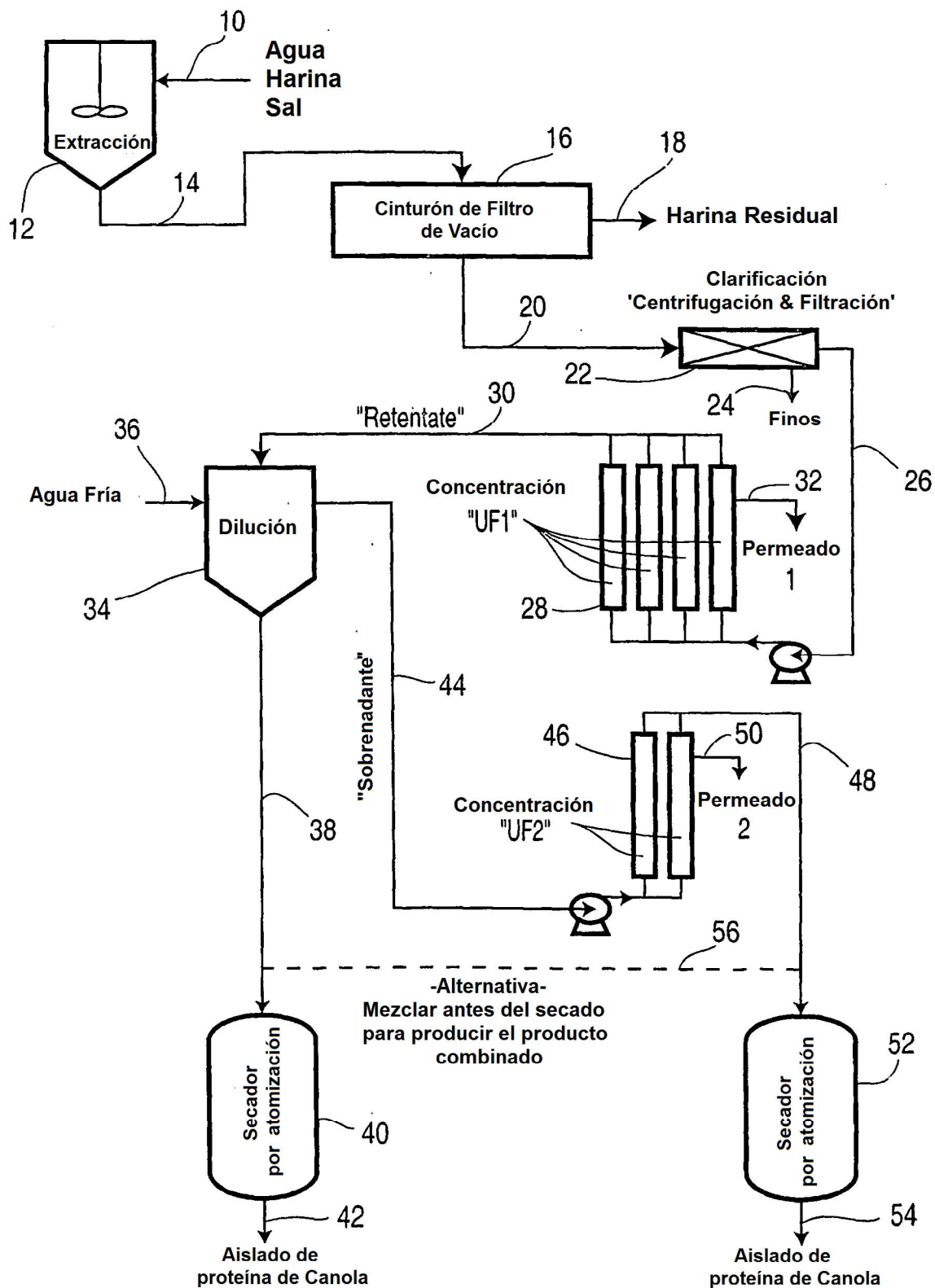


Figura 2

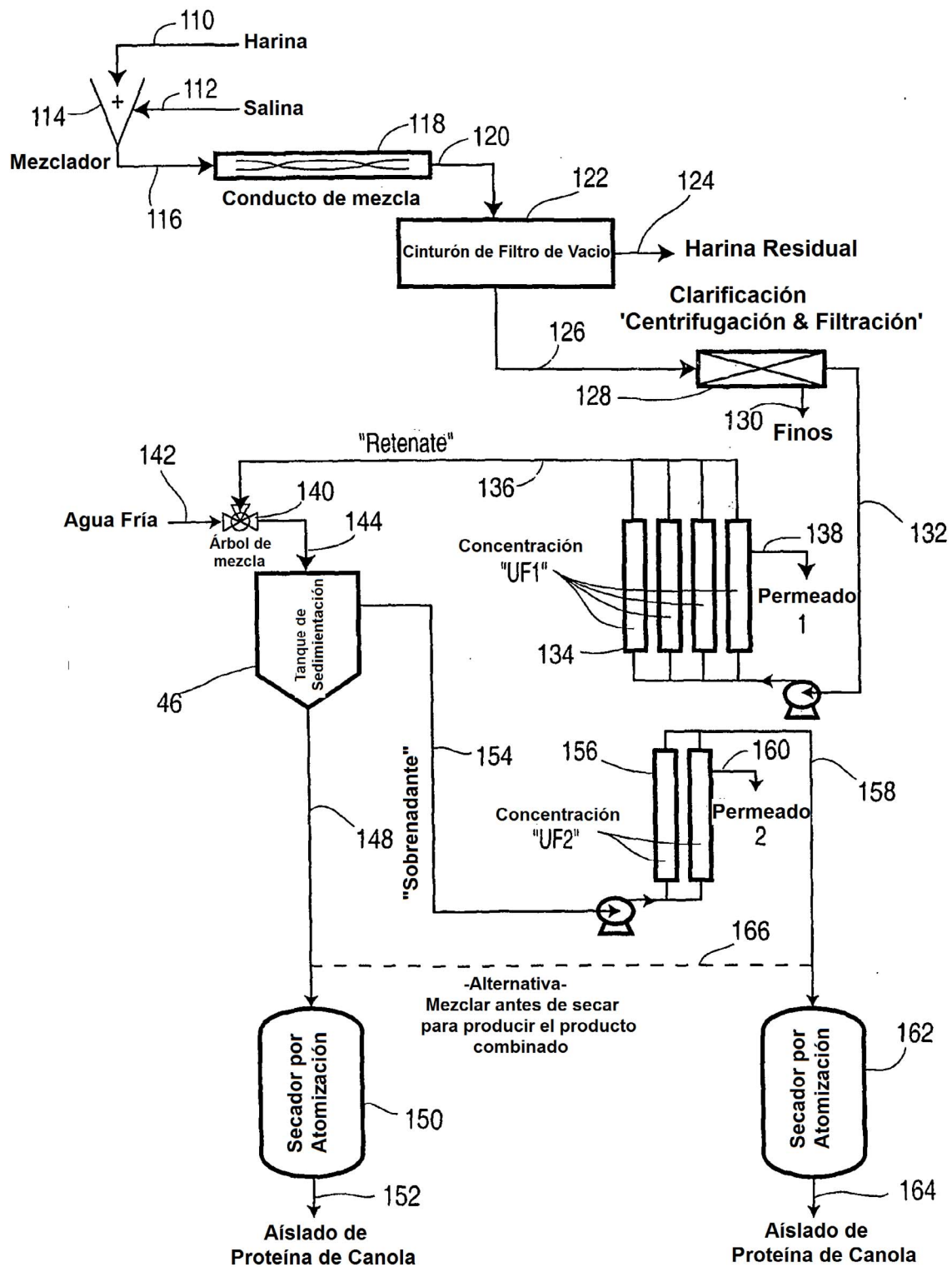


Figura 3

Cromatograma de HPLC analítica del extracto salino 0.05M de
Harina a baja Temperatura a Temperatura Ambiente

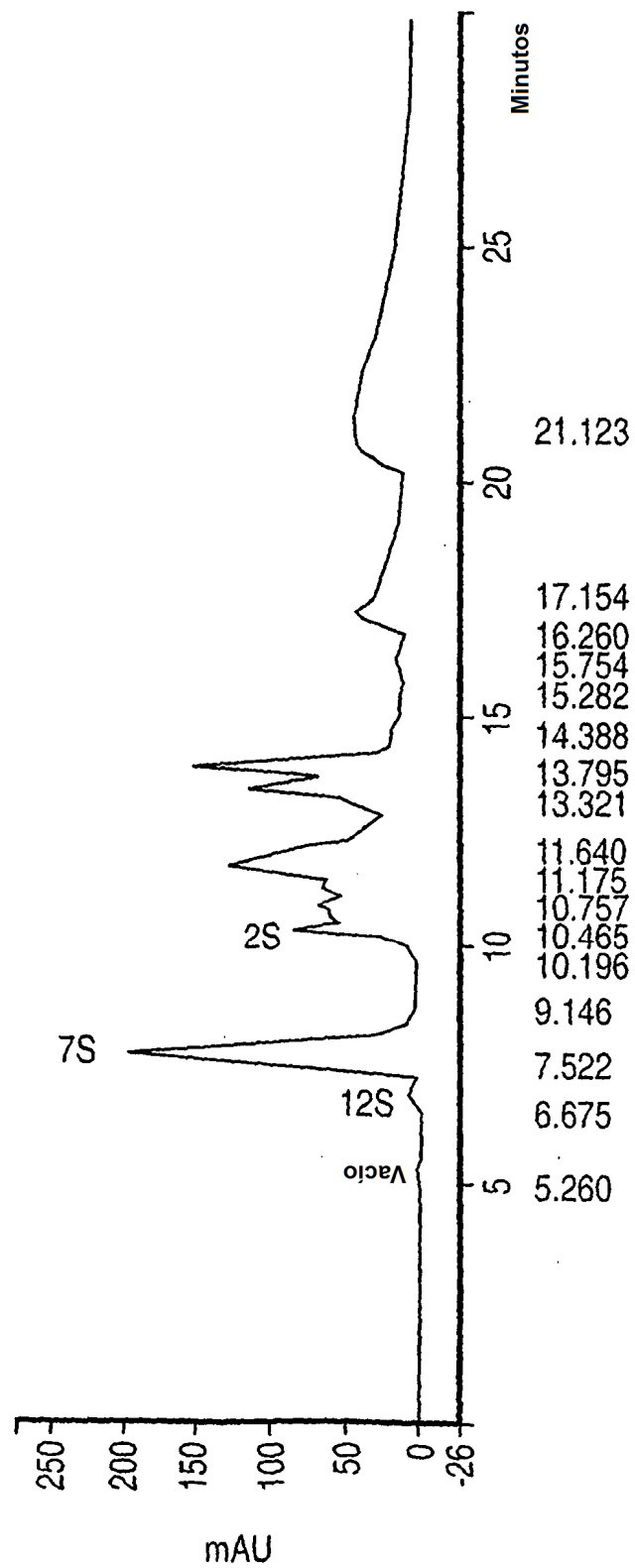


Figura 4

Cromatograma HPLC Analítico del extracto salino 0.10M de
Harina a baja Temperatura a Temperatura Ambiente

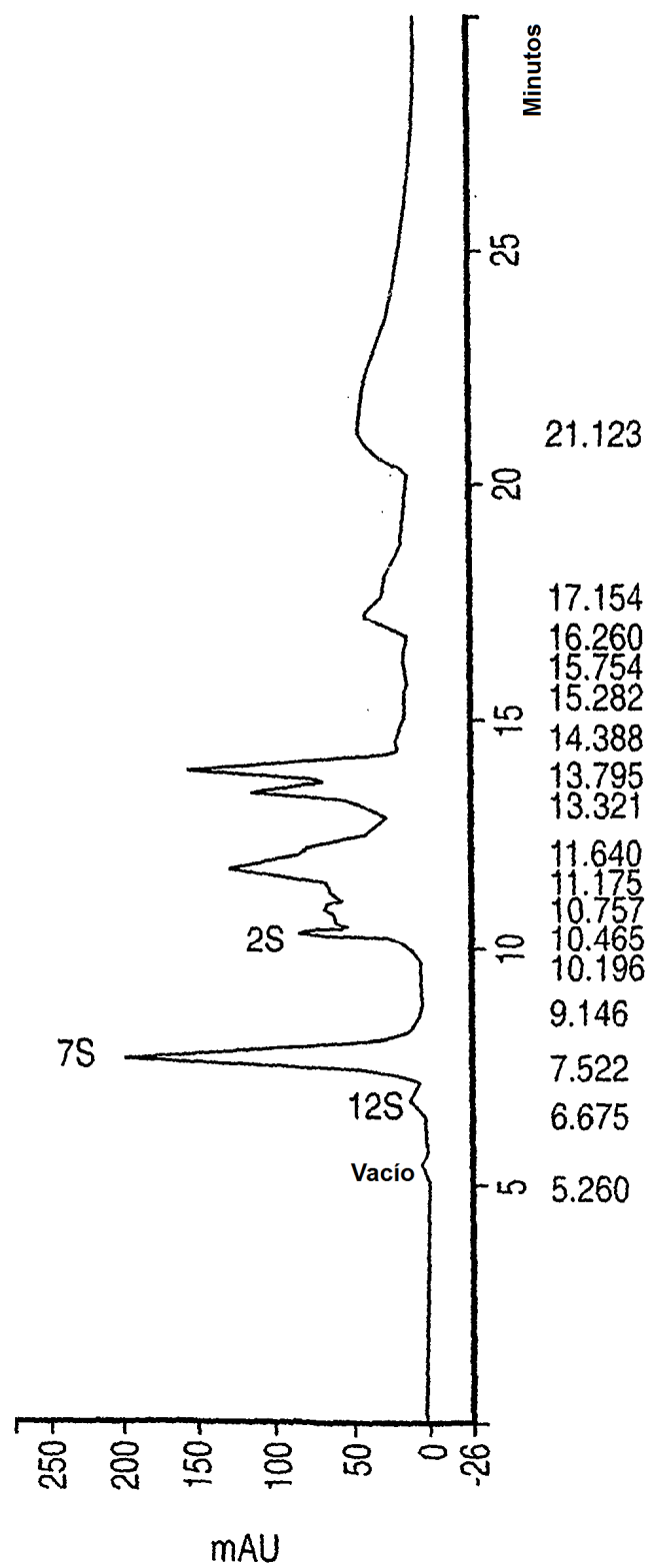
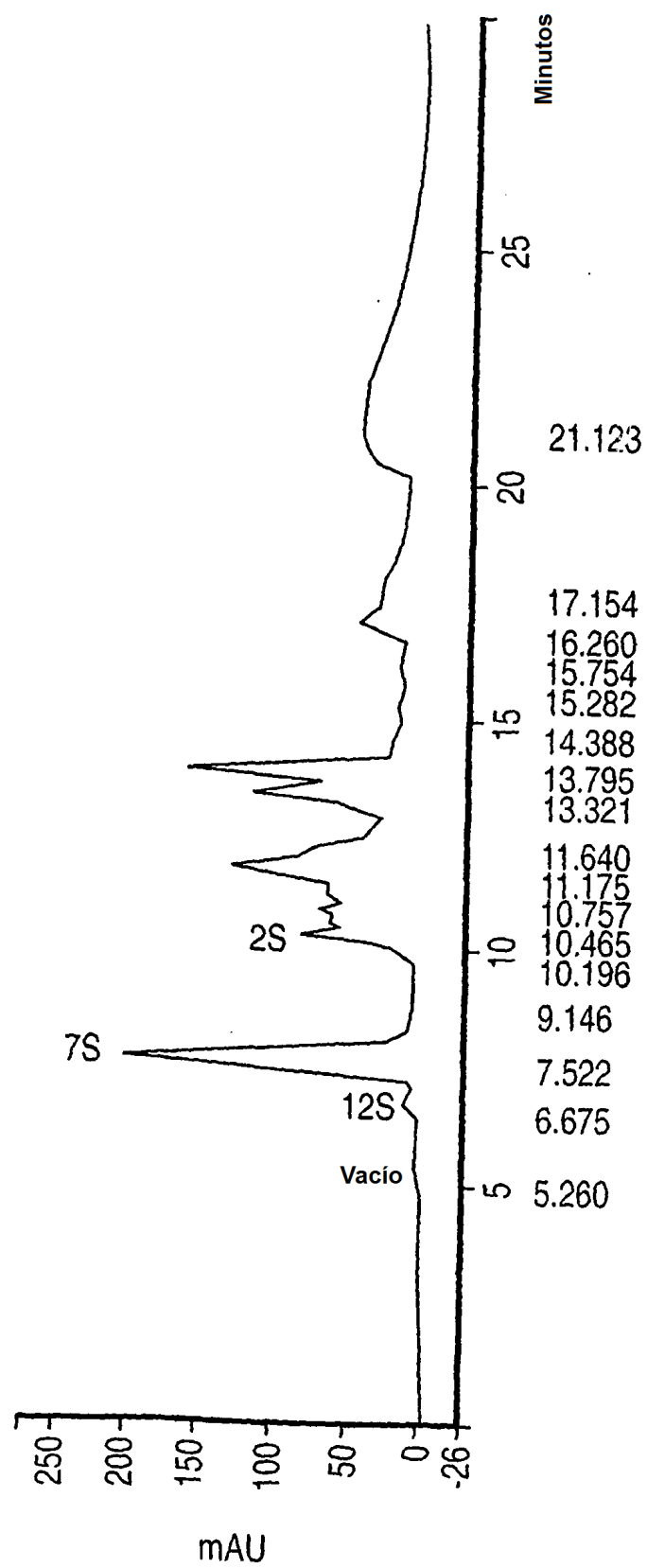
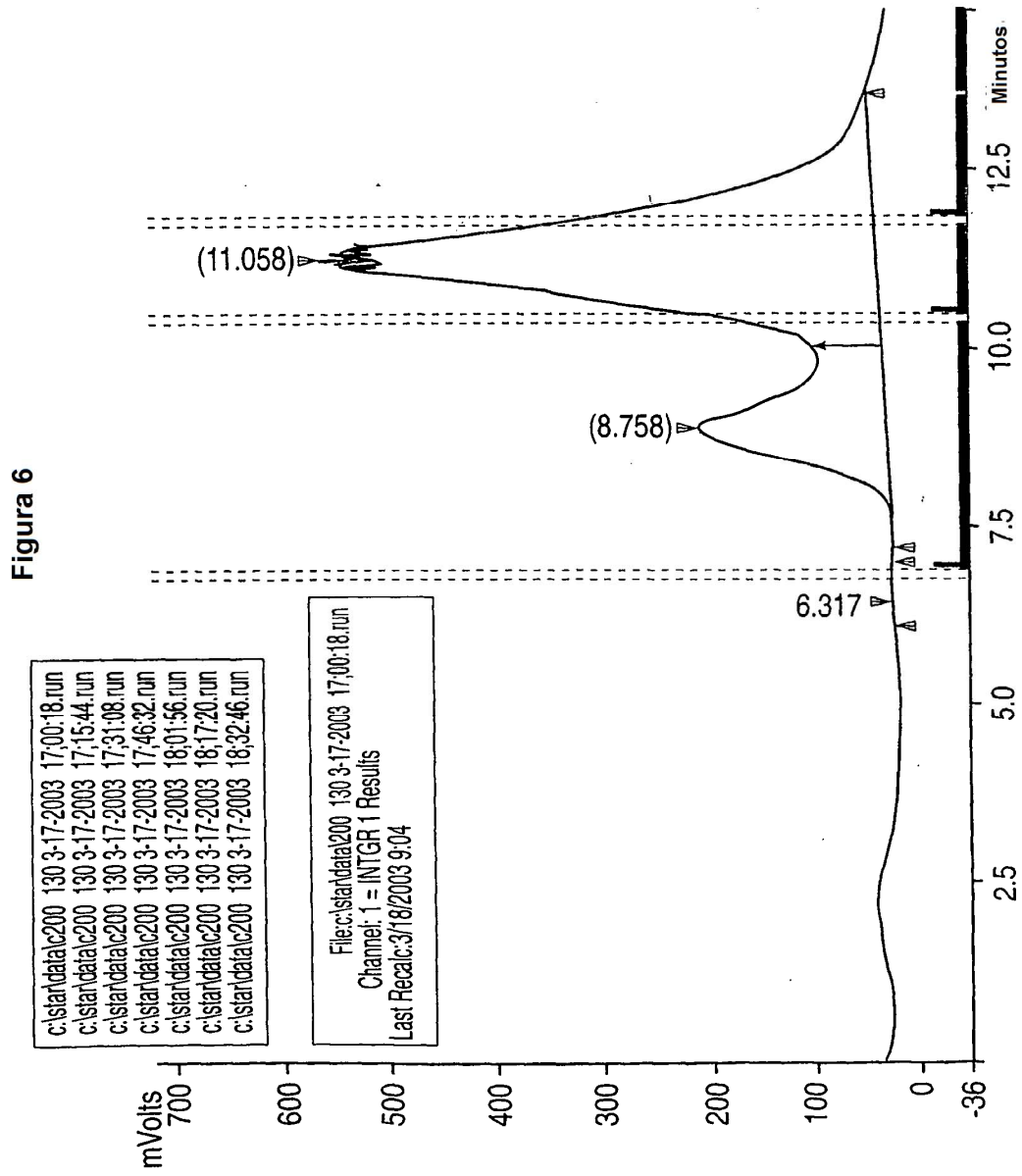
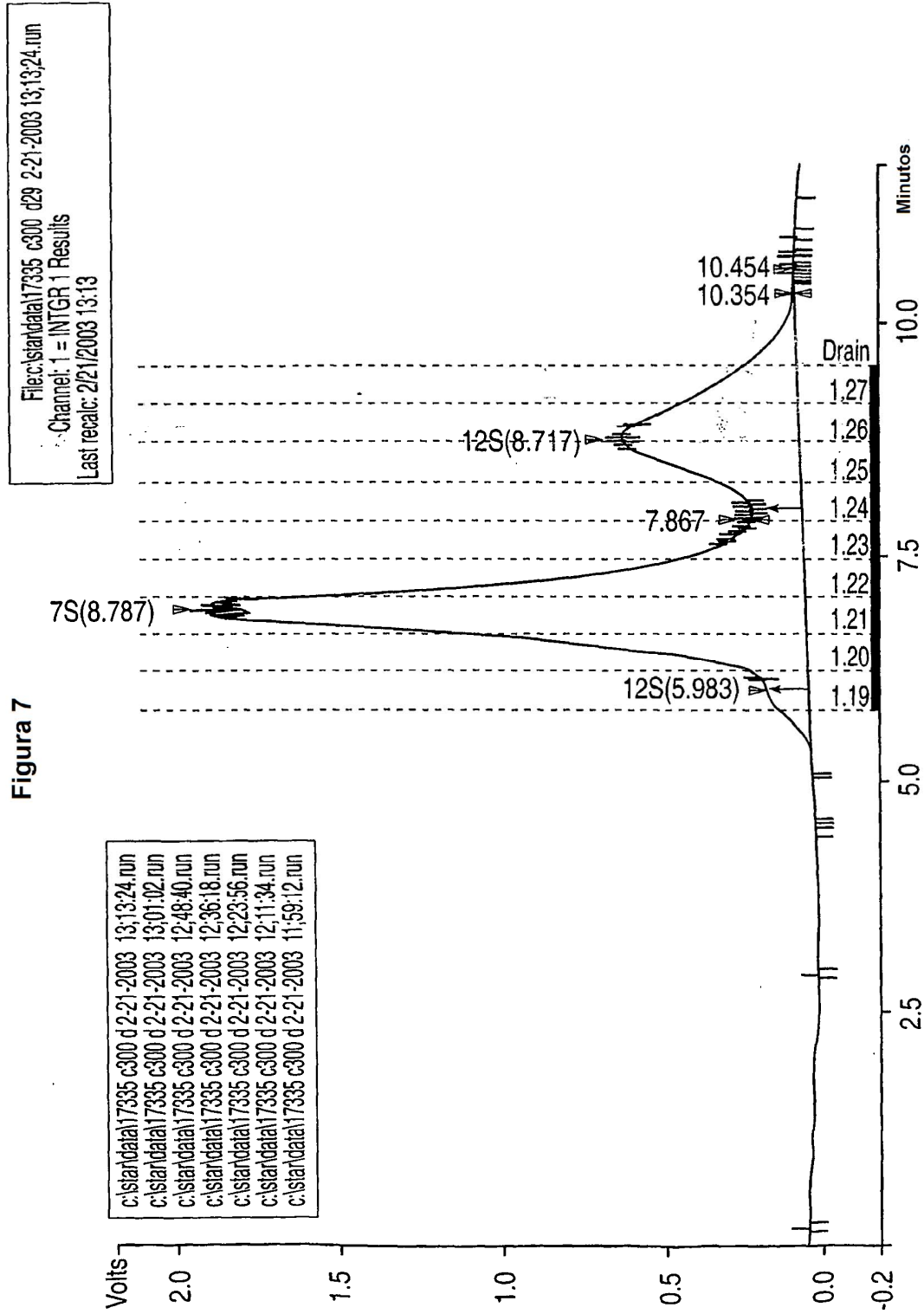


Figura 5

Cromatograma HPLC Analítico de Harina a baja Temperatura
a 60 °C







REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCION

Esta lista de referencias citada por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de la patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de patentes citadas en la descripción

- US 10137391 B [0002] [0003] [0004] [0006]
- US 20030125526 A [0002] [0003] [0004] [0006]
- US 10298678 B [0005]
- US 20040039174 A [0005]

10 • JP H03201611 B [0008]

- JP H0543597 B [0008]
- DE 10035292 [0008]
- US 5844086 A [0041] [0050]
- US 6005076 A [0041] [0050]

15 Literatura no-patente citada en la descripción

- Raab et al. *Die Nahrung*, 1992, vol. 36 (3), 239-247 [0008]
- Krzyzaniak et al. *Die Nahrung*, 1998, vol. 42 (3/4), 201-204 [0008]
- Food Chemistry. Marcel Dekker, 1996, 330 [0157]
- Monsalve et al. *J. Experimental Botany*, January 1990, vol. 41 (222), 89-94 [0159]

20 • Mieth et al. *Die Nahrung*, 1983, vol. 27 (7), 675-697 [0159]

- Gehrig et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, April 1996, vol. 93, 3647-3652 [0160]
- Ericson et al. *J. Biological Chem.*, November 1986, vol. 261 (31), 14576-14581 [0160]
- Mieth et al. *Die Nahrung*, 1983, vol. 27 (7), 678-697 [0162]