SE
SECRETARIA DE ECONOMIA

Institut M xican d la Pr pi dad Industrial

TÍTULO DE PATENTE NO. 329593

Titular(es):	CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO A.C.
D micilio:	Av. Normalistas No. 800, Col. Colinas de la Normal, 44270, Guadalajara, Jalisco, MÉXICO
Denominación:	PROCESO PARA LA OBTENCIÓN DE POLVO ENZIMÁTICO CON ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA A PARTIR DE SUBPRODUCTOS DE COSECHA DE PAPAYA
Clasificación:	Int.Cl.8: A23L1/305
Inventor(es):	SANTIAGO GALLEGOS TINTORE; INGRID MAYANIN RODRÍGUEZ BUENFIL; JUAN CARLOS MATEOS DIAZ

SOLICITUD

Números: MX/a/2009/013997

Fecha de presentación: 17 de diciembre de 2009

Hora: 15:58

PRIORIDAD

País:

Fecha:

Número:

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 17 de diciembre de 2029

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.), [illegible] reformada el 02/08/1994, 25/10/1995, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009,06/01/2010, 18/06/2010, 27/01/2012 y [illegible]/2012), artículos 1º, 3º fracción V inciso a), sub inciso iii) 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º [illegible] sub inciso iii), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial [illegible] reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) y antepenúltimo párrafo del [illegible] delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

Fecha de expedición: 13 de febrero de 2015

DIRECTOR DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES, ÁREAS MECÁNICA, ELÉCTRICA Y REGISTROS DE DISEÑOS INDUSTRIALES Y MODELOS DE UTILIDAD

PEDRO DAVID FRAGOSO LÓPEZ

Arenal No. 550 Piso 1
Col. Pueblo Santa María Tepepan
Delegación Xochimilco
C.P. 16020 México, D.F.
Tel. (55) 53 34 07 00 www.impi.gob.mx

MX/2015/37994

329593
13/2/15

2009/13997

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

"Proc so para la obtención d polvo nzimático con actividad proteolitica a partir de subproductos de cosecha de papaya"

CAMPO TECNICO

La presente invención pertenece al campo del aprovechamiento integral de residuos agroindustriales, aplicables en la industria de alimentos, bebidas y farmacéutica.

ANTECEDENTES

México es un destacado productor de papaya a nivel mundial y la cosecha de sta fruta genera una importante cantidad de subproductos (hojas, tallos, frutos verd s), hasta el momento poco aprovechados. Sin embargo, tales subproductos son una fuente de biocatalizadores de interés industrial ya que estudios señalan diferentes hidrolasas en todos los tejidos de la planta de papaya (Azarkan y col., 2003.; Balls y col., 1940; Glibota y col. 2000). El látex del papayo es una suspensión lechosa rica en hidrolasas que se obtiene generalmente del rayado de los frutos, y contiene principalmente cuatro cisteín proteasas papaína, caricaína, quimopapaína y papaya proteinasa. En su forma seca, el látex es conocido como papaína comercial, pero en realidad es una mezcla de las cuatro proteasas mencionadas. La papaína comercial tiene la capacidad de hidrolizar proteínas denominada actividad proteolítica, por lo que se utiliza en diversas aplicaciones industriales como clarificador de la cerveza, ablandador de carnes, en preparación d hidrolizados enzimáticos entre otras, así como aplicaciones farmacéuticas, tal s como el tratamiento de artritis, enfermedades vasculares, osteoporosis e incluso cáncer (Siewinsky y col. 1996; Monti y col., 200; Bandyopadhyay y col., 2002; Bromme y col., 2004).)

Actualmente existe las patentes ES8604303, WO8504415, EP0175786, GB2156821,US5380656, MX/PA/a/1997/008544, las cuales protegen diversos procesos para la obtención de papaína comercial, sin embargo, ninguna de esos procesos, obtiene polvo enzimático a partir de pecíolos, tallos de la planta, hojas,

raices, cogollos los cual s se l s denomina subproductos d cosecha de papaya. Con este proceso se demuestra que no solamente se puede emplear el látex de los frutos para obtener papaína comercial, sino que también de los subproductos sin valor agregado que al ser procesados tal y como se describe en la presente invencion, dan como resultado polvos enzimáticos con actividad proteolítica.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

DESCRIPCIÓN

Los detalles característicos de éste proceso para la obtención de polvo enzimatico con actividad proteolítica a partir de subproductos de cosecha de papaya, se muestran claramente en la siguientes figuras y descripcion:

La figura 1.- Es un Diagrama de Flujo del proceso para la obtención de polvo enzimático con actividad proteolítica a partir de subproductos de cosecha d papaya.

La figura 2.- Consiste en el perfil electroforético de polvos enzimáticos de fruto y tallo obtenidos de los tratamientos con mayor rendimiento. En el estándar de papaína comercial empleado (carril 3), se detectó una banda intensa con peso molecular de 23 kDa correspondiente a la papaína (f). Esta banda se pudo observar también en los carriles 1 y 2, correspondientes a polvos enzimáticos de fruto y tallo respectivamente. En el carril 4 se muestra un marcador de pesos moleculares con valores de 202.8 kDa (a), 115.5 KDa (b), 98.2 kDa (c), 51.3 kDa (d), 37.2 kDa (e), 19.7 kDa (g) y 6.6 kDa (h).

MEJOR MÉTODO CONOCIDO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

El proceso para la obtención de polvo enzimático con actividad proteolítica a partir de subproductos de cosecha de papaya, consiste en las siguientes etapas y que para su mejor comprensión se presenta un Diagrama de Flujo (Figura 1).

A).- *"selección de la materia prima".* La mat ria prima se obtiene de plantaciones de papaya. Se utilizan plantas cuyo ciclo productivo ha concluido y que están destinadas a ser taladas, así como los frutos dañados en estado inmaduro o que no cumplen con las especificaciones de calidad tamaño y forma para su comercialización. Los subproductos son pecíolos, tallos de la planta y frutos verdes. Cada subproducto se procesa por separado.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

B).- *"extracción".* Esta etapa tiene como fin realizar el proceso de separado y triturado. Al tallo se le elimina la corteza antes de ingresar al proceso, el pecíolo se emplea tal cual y el fruto debe ser trozado antes de procesar, además de eliminarle las semillas mediante algún dispositivo mecánico, el principio es triturar el material mediante un disco abrasivo. Respecto al tallo se opta por un molino de rodillos o trapiche en lugar de extractor mecánico por las características del material.

C) *"centrifugación".* A partir de cada subproducto triturado se obtienen extractos acuosos y sólidos como fibra o bagazo. El extracto acuoso obtenido de cada subproducto se centrifuga a 5,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 5°C, para separar la fibra o bagazo presente, la cual precipita y es desechada. Al sobrenadante obtenido se le determina el contenido de Sólidos Solubles Totales (SST) mediante refractometría, empleando un refractómetro manual. El contenido de SST varía dependiendo de la materia prima, entre 3.2±0.47 y 4.5±0.53% para tallo y fruto respectivamente.

D) "concentración del extracto". El sobrenadante se concentra hasta un contenido de SST de 15 a 25%, centrifugando a 14000rpm durante 60 minutos y a 10 °C con membranas de celulosa y tamaño de poro de 3000Da empleando un dispositivo de ultrafiltración Amicon Ultra. Las fracciones concentradas se emplean en la etapa de secado por aspersión.

E) *"encapsulado"*. como agente encapsulante se utiliza carboximetilcelulosa (CMC) a una concentración final de 0.5% p/v, ésta se disuelve en el extracto lentamente con agitación magnética constante a temperatura ambiente para obtener de manera la emulsión a secar.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

F) *"secado por aspersión"* Esta etapa tiene como objeto eliminar el agua contenida en el extracto transformándolo en un polvo seco por medio de la atomización de la emulsión en una corriente de aire caliente en una cámara de secado. El agua se evapora rápidamente permitiendo que las enzimas con actividad proteolítica presentes en la emulsión, queden atrapadas dentro de una película de material encapsulante. En este proceso se utiliza un secador por aspersión a una temperatura fija de 105 °C, manteniendo la presión y flujo de alimentación del equipo constantes a un valor de 3 Bar y 0.9 ml/min respectivamente. El polvo enzimático obtenido se almacena en congelación a -20°C.

El rendimiento del secado puede variar dependiendo del contenido de SST empleado durante el proceso, los valores de rendimiento obtenidos a partir de 1 kg de materia prima fresca (85.2 y 75.4 % de humedad para fruto y tallo respectivamente) utilizando el método mecánico, el contenido de proteína y la actividad proteolítica de los extractos secos se muestran en la tabla siguiente en donde las letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística (P<0.5).

Muestra	**Temperatura (°C)**	**SST (%)**	**Extracto seco (g/Kg)**	**Contenido de proteína (%)**	**Actividad proteolítica (U/g de proteína)**
fruto	105	15	2.28±0.8[a]	0.14±0.001[a]	990 ± 70[a]
fruto	105	20	1.86±0.3[a]	0.13±0.006[a]	1060 ± 20[a]
fruto	105	25	**3.83±1.2[b]**	0.15±0.000[a]	1100 ± 10[a]
tallo	105	15	2.18±0.3[a]	0.08±0.009[a]	730 ± 20[b]
tallo	105	20	2.36±0.3[a]	0.10±0.004[a]	630 ± 30[b]
tallo	105	25	**3.88±2.7[b]**	0.09±0.000[a]	750 ± 90[b]

G).- *"determinación de la actividad proteolítica"* Al polvo enzimático obtenido se le determina la actividad proteolítica siguiendo el método de Kunitz 1947, el cual se caracteriza por su versatilidad ya que permite determinar la actividad proteolítica de varias muestras a la vez. Adicionalmente, se determina el contenido de proteína de los polvos enzimáticos según Bradford 1976, y el peso molecular por electroforesis según el método de Schagger y Jagow 1987.

En el perfil electroforético (Fig. 2), la presencia de una sola banda en el gel SDS-PAGE se debe a que las proteasas de la papaya tienen pesos moleculares similares. Como ejemplos claros de esto se encuentran la papaína con 23.4 kDa (f), caricaína de 23.5 kDa, quimopapaína con 27 kDa y papaya endopeptidasa de 28 kDa, enzimas que aun presentando pesos moleculares semejantes, su secuencia aminoacídica es diferente (Huet y col., 2006; Etaba y col., 1962).

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

REIVINDICACIONES

Después de haber descrito lo suficiente nuestra invención, consi[illegible] nuestra exclusiva propiedad lo contenido en las siguientes cláusulas:

1.- Un proceso para la obtención de polvo enzimático con actividad proteolítica a partir de subproductos de cosecha de papaya, que comprende las siguientes etapas:

a) seleccionar la materia prima: los subproductos de cosecha de la papaya a emplearse son pecíolos, tallos de la planta y frutos verdes, los cuales se seleccionan manualmente y se procesan por separado;

b) triturar: los subproductos de cosecha de papaya son triturados para disminuir el tamaño de partícula empleando un extractor mecánico;

c) centrifugar: el extracto acuoso obtenido en la etapa (b) es centrifugado a 5,000 rpm durante 20 minutos a una temperatura de 5°C para separar la fibra o bagazo presente;

d) concentrar del extracto: el sobrenadante de la etapa (c) se concentra hasta un contenido de sólidos solubles totales de 15 a 25%, empleando dispositivos de ultrafiltración por centrifugación a 14000 rpm durante 60 minutos a 10 °C empleando membranas de celulosa de 3 kDa;

e) encapsular: adición al extracto concentrado de la etapa (d) de un agente encapsulante llamado carboximetilcelulosa hasta una concentración de 0.5% p/v la cual se disuelve lentamente en el extracto con agitación magnética a temperatura ambiente;

f) secar por aspersión: el producto de la etapa (e) es secado con un secador por aspersión empleando una temperatura de 105 °C;

g) determinar la actividad proteolítica y contenido de proteína del producto de la etapa (f).

2.- Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 en donde se incluyen todos los subproductos de cosecha de cualquier variedad de papaya (tallos, hojas, raíces, frutos, cogollos, pecíolos).

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

3.- Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 en donde se emplean subproductos de cosecha de las plantas en cualquier etapa de su ciclo reproductivo.

4.- Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 en donde se emplean subproductos de cosecha de las plantas cuyo ciclo reproductivo ha concluido después de dos años de producción continua.

5.- Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 etapa (b) en donde el extractor mecánico para la obtención de los extractos enzimáticos es un disco abrasivo.

6.- Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 etapa (b) en donde el extractor mecánico para la obtención de los extractos enzimáticos es un trapiche.

7.- Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 etapa (b) en donde se emplea una prensa hidráulica para la obtención de los extractos enzimáticos acuosos.

8. Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 etapa (d) en donde el rango del tamaño del poro de la membrana es de 3 a 23 kDa.

9. Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 etapa (d) en donde el contenido de sólidos disueltos totales del extracto puede variar de 15 a 25 %.

10. Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 etapa (f) en donde el flujo de alimentación es de 0.9ml /min.

11. Un proceso como el descrito en la reivindicación 1 etapa (f) en donde la presión del equipo es de de 3 Bar.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

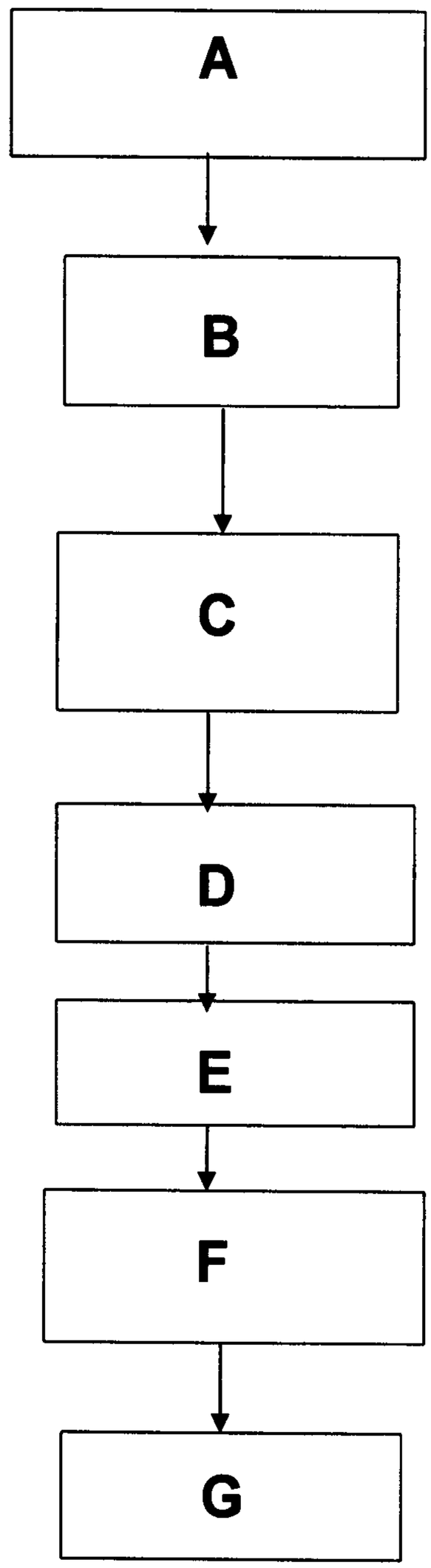
RESUMEN

Esta novedosa invención logra utilizar todos los subproductos de cosecha de cualquier variedad de papaya (tallos, hojas, raíces, frutos, cogollos, pecíolos) de plantas cuyo ciclo reproductivo ha concluido después de dos años de producción continua.

Este proceso involucra el empleo de métodos mecánicos para procesar los subproductos y obtener a partir de estos extractos acuosos, los cuales son concentrados mediante centrifugación empleando dispositivos de ultrafiltración con membranas de celulosa, para posteriormente ser secados por aspersión añadiendo previamente un encapsulante al extracto, obteniéndose un polvo con actividad proteolítica.

Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

FIGURA 1



Instituto
Mexicano
de la Propiedad
Industrial

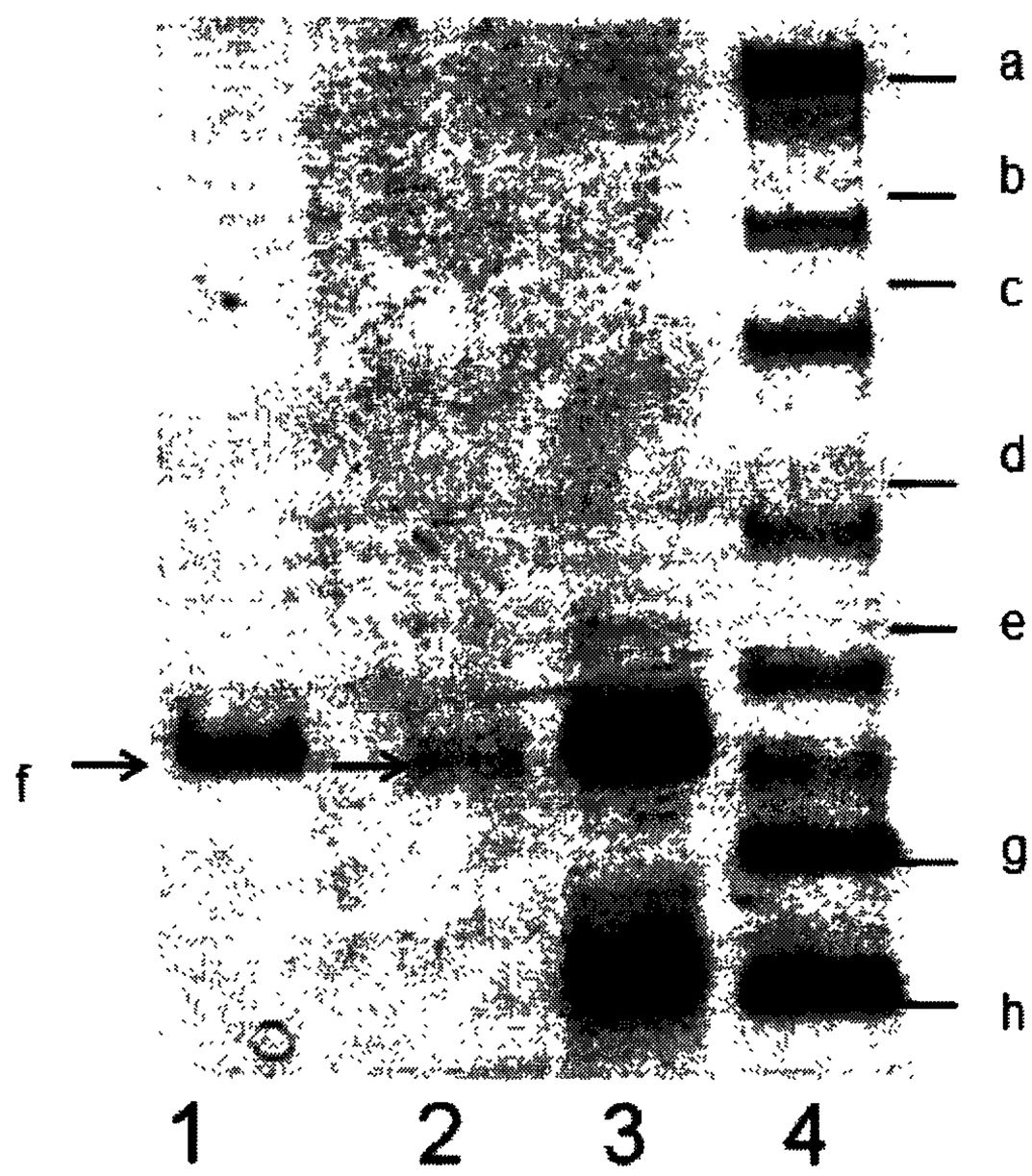



FIGURA 2