



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 351 021**

⑫ Número de solicitud: 200930445

⑬ Int. Cl.:
G01N 33/02 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **13.07.2009**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **31.01.2011**

Fecha de la concesión: **15.12.2011**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:
28.01.2011

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **27.12.2011**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
27.12.2011

⑲ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑳ Inventor/es: **Hernando Álvarez, Alberto;**
Albar Ramírez, Juan Pablo;
Mena Valverde, María Carmen y
Lombardía Uría, Manuel

㉑ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉒ Título: **Método para la extracción de gluten nativo e hidrolizado.**

㉓ Resumen:

Método para la extracción de gluten nativo e hidrolizado. La presente invención se refiere a una composición y un método para la extracción de gluten de alimentos. La presente invención permite la extracción de gluten de alimentos que han sido sometidos a diferentes tratamientos térmicos y/o hidrolíticos y en los que las proteínas que componen el gluten pueden estar hidrolizadas y su estructura modificada. La extracción de gluten mediante esta invención es compatible con sistemas de enzimoinmunoensayo para la cuantificación de gluten como el ELISA Competitivo, así como con otras técnicas empleadas en el análisis de gluten.

ES 2 351 021 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método para la extracción de gluten nativo e hidrolizado.

5 La presente invención se refiere a una composición y un método para la extracción de gluten de alimentos. La presente invención permite la extracción de gluten de alimentos que han sido sometidos a diferentes tratamientos térmicos y/o hidrolíticos y en los que las proteínas que componen el gluten pueden estar hidrolizadas y su estructura modificada. La extracción de gluten mediante esta invención es compatible con sistemas de enzimo-inmunoensayo para la cuantificación de gluten como el ELISA Competitivo, así como con otras técnicas empleadas en el análisis de
10 gluten.

Estado de la técnica anterior

15 La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente al gluten de trigo, cebada, centeno y posiblemente también de la avena. La ingesta de dichas proteínas induce, en personas genéticamente predispuestas, una lesión severa de la mucosa intestinal, que se caracteriza histológicamente por una hiperplasia de criptas con atrofia total o subtotal de las vellosidades intestinales. La enfermedad celíaca tiene una incidencia aproximada de 1:100-200 habitantes, aunque existen diferencias geográficas importantes (1:100-1:500) que no siempre pueden adscribirse a diferencias genéticas o ambientales.

20 El gluten es una mezcla de proteínas de almacenamiento de los granos de cereales que forman una red cuando la harina se hidrata y se mezcla. Esta red se debe principalmente a la asociación de prolaminas (denominadas gliadinas en el trigo, hordeínas en la cebada y secalinas en el centeno) y glutelinas (gluteninas para el trigo, y sus homologas para cebada y centeno) a través de enlaces no covalentes.

25 El único tratamiento posible para los pacientes celíacos es el seguimiento de una dieta estrictamente exenta de gluten de por vida, lo cual implica la ingesta exclusiva de alimentos sin gluten. De ahí la importancia de realizar una correcta cuantificación del contenido en gluten de los alimentos.

30 Teniendo en cuenta los datos científicos y clínicos disponibles sobre la cantidad de gluten que pueden tolerar los pacientes celíacos y basado en las recomendaciones del Codex Alimentarius (ALINORM 08/31/26), recientemente se ha publicado un Reglamento sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten (REGLAMENTO CE No 41/2009) aplicable a todos los estados miembros de la Unión Europea y en el que se establece que los productos alimenticios pueden llevar en su etiquetado el término “exentos de
35 gluten” si el contenido de gluten no sobrepasa los 20 mg/kg en total, medido en los alimentos tal como se venden al consumidor final. Asimismo, aquellos productos alimenticios etiquetados con la mención “contenido muy reducido de gluten” no contendrán un nivel de gluten que supere los 100 mg/kg en los alimentos tal como se venden al consumidor final.

40 Por ello, y para asegurar el cumplimiento de dicho Reglamento, es esencial que las técnicas analíticas disponibles para la extracción y cuantificación de gluten sean lo más exactas y precisas posibles.

45 En la actualidad la técnica empleada de referencia para el análisis de gluten en alimentos es el ELISA R5 Sándwich que está basado en el empleo de un único anticuerpo monoclonal R5 y permite la detección de manera simultánea de gluten de trigo, cebada y centeno con un límite de cuantificación de 3 ppm de gluten. Este ELISA representa un sistema específico, de gran fiabilidad y altamente sensible para la detección de gluten de trigo, cebada y centeno en alimentos para celíacos.

50 El anticuerpo R5 reconoce específicamente el epítipo constituido por la secuencia de aminoácidos QQPFP, y algunas relacionadas presentes en una serie de secuencias descritas como potencialmente tóxicas para los celíacos y que están muy repetidas en todas las fracciones de gliadinas, hordeínas y secalinas. Además, este sistema es capaz de detectar el péptido 33 mer y otros cuya implicación en la patogénesis de la enfermedad celíaca ha sido demostrada.

55 Este ELISA R5 Sándwich ha sido sometido a un proceso de validación internacional en el que han participado 20 laboratorios europeos y, además, en 2006 la Comisión del Codex Alimentarius de la Organización para la Agricultura y la Alimentación de la ONU (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha aprobado con nivel I el método ELISA R5 Sándwich, desarrollado en la Unidad de Gluten, como método capaz de cuantificar el gluten de los alimentos.

60 Actualmente existen en el mercado varios Kits comerciales de ELISA R5 y tiras inmunocromatográficas basados en el anticuerpo R5, que permiten detectar con garantía la presencia de gluten y se comercializan en un gran número de países de todo el mundo.

65 El ELISA-R5 Sándwich se complementa con un “Cocktail de extracción” (solicitud de patente WO 02/092633 A1) que viene a solventar el problema de extraer el gluten en los alimentos en cuya elaboración existe un tratamiento térmico. Dicho “Cocktail de extracción” solubiliza aquellos agregados insolubles de las fracciones tóxicas del gluten que se han formado por el calor, favoreciendo su solubilidad y permitiendo de esta manera que puedan ser extraídos y cuantificados por el ELISA R5 Sándwich.

No obstante, hay que tener en cuenta que los ingredientes de los alimentos son muy complejos y en el proceso de elaboración pueden verse sometidos a diferentes tratamientos que modifiquen y/o hidrolicen las proteínas. Así, una de las limitaciones del ELISA R5 Sándwich es la imposibilidad de medir correctamente las prolaminas hidrolizadas, debido a que en esta técnica se necesitan al menos dos epítomos (QQFPF) y cuando las proteínas se encuentran hidrolizadas pueden no estar presentes los dos epítomos necesarios. Para solventar este problema se ha desarrollado un sistema también basado en el anticuerpo monoclonal R5, el ELISA R5 Competitivo (solicitud de patente WO 06/051145 A1), que es capaz de medir tanto prolaminas hidrolizadas presentes en alimentos hidrolizados como los siropes y las cervezas, así como las prolaminas intactas, con un límite de cuantificación de 3 ppm de gluten. Así, el sistema de ELISA R5 Competitivo presenta la ventaja respecto al ELISA R5 Sándwich de permitir cuantificar incluso fragmentos de proteínas que sólo contienen un epítopo intacto.

El proceso de extracción es un factor de gran importancia en el análisis de gluten por los sistemas de ELISA R5, tanto Competitivo como Sándwich. Esto es debido en primer lugar a que debe obtenerse un rendimiento lo más cercano posible al 100% para que los resultados sean exactos, y que la cantidad de gluten extraído sea total para garantizar que los alimentos etiquetados como “sin gluten” realmente presentan un contenido en gluten por debajo del límite fijado como máximo permitido.

Hasta ahora, para el sistema de ELISA R5 Competitivo, que como se ha expuesto es el único capaz de cuantificar el gluten presente tanto de forma intacta como hidrolizada, se ha utilizado como sistema de extracción etanol 60% (v/v), ya que el “cocktail de extracción” no es compatible con el sistema de ELISA Competitivo debido a que, en las condiciones en que se lleva a cabo la reacción, los agentes reductores contenidos en el “cocktail de extracción” destruyen el anticuerpo R5 conjugado del ELISA dando lugar a valores muy altos que son irreales y se pueden considerar como falsos positivos o artefactos.

Además, dada la complejidad de los alimentos y la posibilidad de que puedan darse falsos positivos o negativos en los resultados de los análisis, se han desarrollado una serie de técnicas complementarias como el Western blot R5 y los métodos basados en la espectrometría de masas que permiten confirmar los resultados obtenidos mediante el sistema de ELISA R5 y ofrecer datos de análisis muy fiables que garanticen un consumo seguro por parte de la población celíaca. En este sentido y posterior al desarrollo del “cocktail de extracción”, se realizaron modificaciones en el mismo para conseguir que el sistema fuese compatible con la técnica Western blot (Patente WO 07/104825 A1). Así, aún cuando se consiguió que dicho sistema sea compatible, para obtener buenos resultados en muestras con bajo contenido en gluten es necesario llevar a cabo una serie de procesos que permitan eliminar el exceso de sales que pueden dificultar que se realice correctamente el proceso de electroforesis que se lleva a cabo en la técnica de Western blot, lo cual hace el análisis más largo y se pueden perder proteínas de interés en los pasos que se realizan para eliminar las sales.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar un sistema de extracción compatible no sólo con el sistema de ELISA tipo Sándwich sino también con el de tipo Competitivo, que permita extraer la totalidad del gluten y cuya composición no interfiera en la cuantificación mediante este sistema de ELISA. Dicho sistema debe ser además compatible con las técnicas de Western blot, espectrometría de masas y otras técnicas empleadas en el análisis de gluten.

Explicación de la invención

La invención se enfrenta al problema de encontrar una serie de reactivos que permitan extraer todas las proteínas (prolaminas y glutelinas) que componen el gluten presente en una muestra y sean compatibles con el análisis por técnicas enzimoinmunoenzimáticas, como el ELISA Competitivo, dando lugar a una cuantificación correcta, y que además sea compatible con las técnicas de Western blot, espectrometría de masas y otras técnicas empleadas en el análisis de gluten.

Hasta el momento, para la extracción de gluten en alimentos que hayan sido sometidos a un tratamiento térmico se emplea el “Cocktail de extracción” (solicitud de patente WO 02/092633 A1). No obstante, dicho “Cocktail” no es compatible con el sistema de ELISA R5 Competitivo por lo que en aquellos alimentos en los que el gluten está hidrolizado y además están tratados con calor es imposible obtener un resultado fiable, ya que al no existir un sistema de extracción compatible sólo se puede emplear Etanol 60% que no permite extraer la totalidad del gluten en este tipo de muestras. Así, el resultado es que la cuantificación de gluten es inferior a la real, poniendo por tanto en peligro la salud de los celíacos que puedan consumir un alimento etiquetado con una menor cantidad de gluten de la que realmente tiene.

Los inventores han demostrado que empleando una composición que comprende tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) y N-Lauroilsarcosina en un tampón a un pH de entre 7 y 8, se consigue extraer por completo el gluten intacto e hidrolizado presente en alimentos tratados o no con calor, y además es compatible con el sistema de ELISA Competitivo, consiguiéndose por tanto una cuantificación total del gluten presente en la muestra tanto de forma intacta como hidrolizada y que además ha sido sometida a diferentes tratamientos durante su elaboración.

El rendimiento de extracción de gluten en alimentos conseguido con este nuevo sistema de extracción combinado con el ELISA Competitivo es superior al del anterior sistema de “Cocktail de extracción” combinado con el ELISA R5 Sándwich (único sistema para el que es compatible dicho cocktail) y además el rendimiento es también superior a la extracción con Etanol al 60% combinado con el ELISA R5 Competitivo (único sistema disponible para alimentos en los que el gluten está hidrolizado).

Por otro lado, se ha comprobado que la composición descrita en la presente invención también es compatible con el ELISA tipo Sándwich, obteniéndose valores comparativamente similares respecto al sistema de Cocktail de extracción. Por tanto, la composición descrita en la presente invención presenta las ventajas de (i) extraer por completo la cantidad de gluten intacto o hidrolizado presente en alimentos tratados o no con calor, (ii) ser compatible con sistemas de ELISA como por ejemplo los sistemas de ELISA R5 (Sándwich y Competitivo), (iii) ser compatible con las técnicas confirmatorias empleadas en el análisis de gluten (Western blot R5 y Espectrometría de Masas entre otras). Por todo ello el empleo de esta nueva composición proporciona un dato muy fiable del contenido total y tipo de gluten en los alimentos.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición (de ahora en adelante, composición de la invención) que comprende:

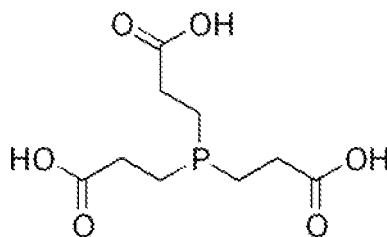
a) tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o una sal de la misma,

b) N-Lauroilsarcosina o una sal de la misma, y

c) un tampón

y que se encuentra a un pH de entre 7 y 8.

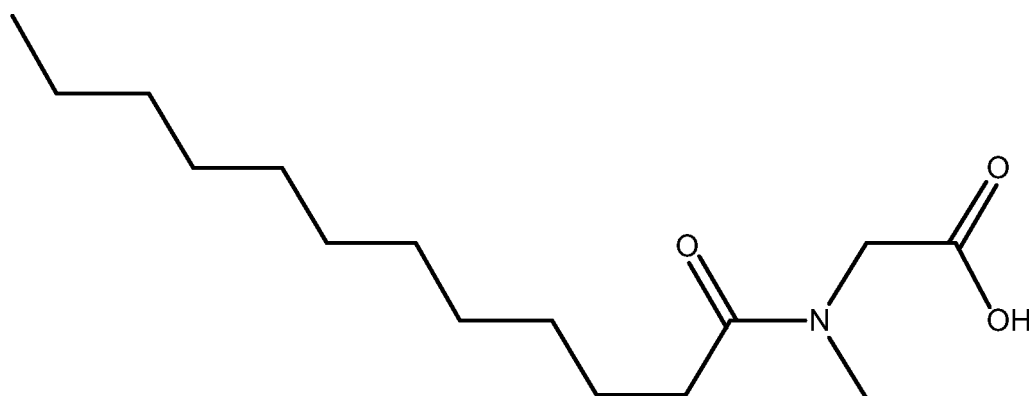
La Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) es un agente reductor de fórmula (I), inodoro, más estable, más específico de los puentes disulfuro y menos tóxico que otros agentes reductores utilizados comúnmente (Burns *et al.* 1991. J. Org. Chem. 56:2648-50; Han *et al.* 1999. Previews 2(4): 16-21).



I

En una realización preferida de este primer aspecto, la composición de la invención comprende tris(2-carboxietil)fosfina o su sal a una concentración de entre 2 mM y 5 mM.

La N-Lauroilsarcosina es un agente disgregante de fórmula (II), cuya función es la de abrir las cadenas polipeptídicas de las proteínas permitiendo la completa recuperación del gluten presente en la muestra (Finel *et al.* Eur J Biochem. 1994 Nov 15; 226(1):237-42).



II

En una realización preferida de este primer aspecto, la composición de la invención comprende N-Lauroilsarcosina o su sal en una proporción de entre el 1% y el 6% peso/volumen.

El tampón puede ser cualquier disolución reguladora del pH que tampona la reacción a un rango de pH entre 7 y 8 como, por ejemplo, pero sin limitarse, Tris-Clorhídrico o una solución salina con fosfatos (PBS). En una realización preferida de este primer aspecto, la composición de la invención comprende un tampón que se selecciona de la lista que comprende: Tris-Clorhídrico o PBS.

Cada uno de los reactivos por separado o el conjunto de los mismos, a la concentración para la que se ha optimizado el proceso, no afecta negativamente a la cuantificación de gluten mediante ELISA Competitivo y Sándwich ni a su caracterización por las técnicas de Western blot y espectrometría de masas.

Un segundo aspecto de la presente invención, se refiere al uso de la composición de la invención para la extracción de gluten de una muestra.

El término “gluten”, tal y como se emplea en la descripción, se refiere a una mezcla de proteínas que comprende prolaminas y/o glutelinas, y/o los péptidos derivados de dichas proteínas.

En una realización preferida de este segundo aspecto de la invención, la muestra es un alimento. Por “alimento” se entiende cualquier sustancia que introducida en el organismo sirva para nutrir, construir o reparar tejidos, proveer energía o regular procesos corporales. Dependiendo de la naturaleza del alimento, puede ser necesario moler y homogeneizar el mismo antes de extraer el gluten del mismo.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a una preparación combinada (de ahora en adelante, preparación combinada de la invención) para su uso en la extracción de gluten de una muestra que comprende:

- a) tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o una sal de la misma,
- b) N-Lauroilsarcosina o una sal de la misma, y
- c) un tampón.

En una realización preferida de este tercer aspecto, la preparación combinada de la invención comprende tris(2-carboxietil)fosfina o su sal a una concentración de entre 2 mM y 5 mM.

En una realización preferida de este tercer aspecto, la preparación combinada de la invención comprende N-Lauroilsarcosina o su sal en una proporción de entre el 1% y el 6% peso/volumen.

En una realización preferida de este tercer aspecto, la preparación combinada de la invención comprende un tampón que se selecciona de la lista que comprende: Tris-Clorhídrico o PBS.

El término “preparación combinada” o también denominada “yuxtaposición”, en esta memoria, significa que los componentes de la preparación combinada no necesitan encontrarse presentes como unión, por ejemplo, en una composición, para poder encontrarse disponibles para su aplicación simultánea. De esta manera, la expresión “yuxtapuesta” implica que no resulta necesariamente una combinación verdadera, a la vista de la separación física de los componentes.

En una realización preferida de este tercer aspecto de la invención, la muestra es un alimento.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a un método de extracción de gluten de una muestra (de ahora en adelante, método de la invención) que comprende:

- a) añadir a la muestra la composición de la invención,
- b) incubar el producto resultante del paso (a),
- c) añadir al producto resultante del paso (b) una solución acuosa de etanol,
- d) incubar el producto resultante del paso (c), y
- e) separar del producto resultante del paso (d) el sobrenadante que contiene el gluten extraído.

En una realización preferida de este cuarto aspecto, en el paso (a) del método de la invención, la relación de peso/volumen muestra:composición es de entre 1:5 y 1:20.

En una realización preferida de este cuarto aspecto, en el paso (b) del método de la invención, se incuba a una temperatura de entre 18 y 25°C durante un periodo de tiempo de entre 40 min y 90 min.

En una realización preferida alternativa de este cuarto aspecto, en el paso (b) del método de la invención, se incuba a una temperatura de entre 40 y 60°C durante un periodo de tiempo de entre 10 min y 50 min. En una realización más preferida, en el paso (b) del método de la invención, se incuba a una temperatura de entre 40 y 60°C durante un periodo de tiempo de entre 20 min y 40 min.

Preferiblemente, cuando en el paso (b) se incuba a una temperatura de entre 40 y 60°C, el producto resultante de la incubación del paso (b) posteriormente se enfría a una temperatura de entre 18°C y 25°C. Por tanto, en una realización más preferida de este cuarto aspecto, el método de la invención comprende un paso adicional entre el paso (b) y el paso (c) en el que el producto resultante del paso (b) se enfría a una temperatura de entre 18°C y 25°C.

En una realización preferida de este cuarto aspecto, el etanol se encuentra en una proporción de entre el 40% y el 70% del volumen total del producto resultante del paso (c) del método de la invención.

En una realización preferida de este cuarto aspecto, en el paso (d) del método de la invención, se incuba a una temperatura de entre 18°C y 25°C durante un periodo de tiempo de entre 30 min y 70 min. En una realización más preferida de este cuarto aspecto, en el paso (d) del método de la invención, se incuba a una temperatura de entre 18°C y 25°C durante un periodo de tiempo de entre 40 min y 60 min.

En una realización preferida de este cuarto aspecto, la separación del paso (e) comprende la centrifugación de la muestra. En una realización más preferida, dicha centrifugación se realiza a una velocidad de giro de entre 2000 y 4000 g durante un periodo de tiempo de entre 5 min y 20 min. Dicha centrifugación permite separar el pellet del sobrenadante que contiene el gluten extraído para su posterior análisis por las diferentes técnicas disponibles de análisis de gluten.

En una realización preferida de este cuarto aspecto de la invención, la muestra es un alimento.

Un quinto aspecto de la invención, se refiere a un kit (de ahora en adelante, kit primero de la invención) para llevar a cabo el método de la invención que comprende:

- la composición de la invención, y
- etanol.

Un sexto aspecto de la invención, se refiere a un kit (de ahora en adelante, kit segundo de la invención) para llevar a cabo el método de la invención que comprende:

- la preparación combinada de la invención, y
- etanol.

El kit primero o segundo de la invención además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, agentes para prevenir la contaminación, controles positivos y/o negativos, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra una comparativa de los resultados obtenidos tras análisis con ELISA R5 Sándwich de los panes de maíz tras extracción del gluten con los diferentes sistemas de extracción.

Figura 2. Muestra una comparativa de los resultados obtenidos tras análisis con ELISA R5 Competitivo de los panes de maíz tras la extracción del gluten con Etanol 60% y con la composición de la invención (UPEX).

Figura 3. Muestra el análisis por Western blot R5 del gluten extraído empleando UPEX de los siguiente alimentos: A (Almidón de trigo), B (Galleta), C (Cerveza A), D (Cerveza B), E (Pasta), F (Producto bollería), G (Producto cárnico), H (Masa panificable).

Figura 4. Muestra el análisis por Western blot R5 del gluten extraído empleando UPEX (A) o EtOH 60% (B) de los siguiente alimentos: A (Estándar Europeo), B (Aperitivo tostado), C (Fideo de Arroz), D (Galleta), E (Pasta), F (Producto bollería), G (Galleta), H (Caldo), I (Almidón de maíz).

Figura 5. Muestra el análisis por Western blot R5 del gluten extraído empleando Cocktail-SDS sin realizar precipitación de las sales de las siguientes muestras: A (Estándar Europeo), B (Aperitivo tostado), C (Fideo de Arroz), D (Galleta), E (Pasta), F (Producto bollería), G (Galleta), H (Caldo), I (Almidón de maíz).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Recuperación del contenido en gliadinas en panes de maíz que contienen una cantidad conocida de gliadinas intactas o de gliadinas hidrolizadas

Este ensayo se realizó para comparar la eficacia del procedimiento proporcionado por esta invención frente al procedimiento habitual empleado con el sistema de ELISA R5 Sándwich (Cocktail de extracción) así como con el sistema desarrollado posteriormente que es compatible con el Western blot pero tampoco lo es con el ELISA R5 Competitivo (Cocktail de extracción-SDS) ni con espectrometría de masas.

1.1. Materiales

Para la realización de este ejemplo se emplearon los siguientes alimentos y soluciones:

- Alimentos: (1) Panes de maíz, elaborados a partir de materias primas que han sido analizadas previamente para confirmar que no contienen gluten, a los que durante el amasado del pan se han añadido cantidades conocidas de gliadinas (prolaminas de trigo) intactas y han sido sometidos a altas temperaturas (180°-220°) durante el proceso de elaboración. De esta forma se consiguen unas muestras en las que el contenido en gliadinas es muy homogéneo y además han sido sometidas a un tratamiento térmico por lo que es esperable que las proteínas hayan sufrido modificaciones. Ambas cosas sería equivalente a conseguir un alimento lo más similar posible a los que se encuentran disponibles comercialmente y que pueden presentar cantidades cuantificables de gluten bien por haberse contaminado antes, durante o después de su elaboración. (2) Panes de maíz elaborados de forma similar a los anteriores pero a los que se ha añadido, en lugar de gliadinas intactas, gliadinas hidrolizadas previamente con enzimas proteolíticas. De esta forma se consigue un alimento lo más similar posible a los que se encuentran disponibles comercialmente en los que se ha producido un tratamiento que puede llevar a la hidrólisis de las proteínas. (3) Pan de maíz elaborado de la misma forma que los anteriores pero al que no se le han añadido gliadinas, que se empleará como control negativo de los experimentos.
- Solución acuosa de etanol 80% (v/v): se prepara mezclando por ejemplo en una probeta, 800 ml de etanol puro (Sigma-Aldrich) y 200 ml de agua milli-Q (resistividad 18 MΩm).
- Composición o "Cocktail de extracción": está constituida por 2 mercaptoetanol 250 mM, Hidrocloruro de guanidinio 2 M y 0,1x de PBS.
- Composición o cocktail-SDS de extracción: está constituida por 2 mercaptoetanol 250 mM, SDS al 6% y PBS 0,1x.
- Composición de la invención, de aquí en adelante UPEX (*Universal prolamins and gluten extractant solution*). Las concentraciones empleadas de los reactivos de entre las posibles, para este ejemplo son las siguientes: N-lauroilsarcosina 2%, TCEP 5 mM, tampón PBS, solución final a pH 7.

1.2. Métodos

Los alimentos a analizar previamente se procesan de la manera habitual procediendo a su molienda, homogeneización y almacenamiento en un recipiente y a temperatura adecuada en función del tipo de muestra. La solución creada (UPEX) se utiliza para extraer gluten de alimentos en una relación de extracción 1:10. Esta mezcla se incuba a 50°C durante 40 minutos. Posteriormente se deja atemperar la mezcla a temperatura ambiente (18°C-25°C) y se añade una solución Etanol/Agua al 80% (v/v) en una proporción 1:4 (v/v) UPEX:Etanol 80% de manera que la solución final contenga Etanol al 60% y se incuba a temperatura ambiente en agitación durante 1 hora. Durante todo el proceso de extracción es necesario tapar correctamente la muestra empleando tubos adecuados y utilizando incluso algún tipo de parafilm para sellar los tapones y de esta forma evitar posibles evaporaciones. Posteriormente se centrifuga a 2500 g durante 10 minutos y se separa el sobrenadante para su análisis.

ES 2 351 021 B1

Este mismo procedimiento se realiza para los otros dos sistemas de extracción empleándolos en lugar del sistema de extracción UPEX.

1.3. Resultados

Los resultados de los análisis empleando las diferentes técnicas y soluciones de extracción de gluten disponibles se reflejan en las siguientes tablas. Se observa como la cuantificación mediante ELISA R5 Competitivo tras extracción con la nueva solución desarrollada UPEX es la única que permite recuperar prácticamente el 100% del gluten presente en todos los tipos de muestras tratadas con calor analizadas, tanto si el gluten está presente de forma intacta como de forma hidrolizada.

TABLA 1

Resultados obtenidos de la cuantificación de gluten en los panes de maíz en los que se ha realizado diferentes extracciones, analizados mediante ELISA R5 Sándwich y ELISA R5 Competitivo. Resultados expresados en ppm de gluten

			ELISA R5 Sandwich				ELISA R5 Competitivo	
			Cocktail de extracción	Cocktail SDS	Etanol 60%	UPEX	Etanol 60%	UPEX
	Gliadinas añadidas	Gluten teórico						
Pan A	54	108	100	97	15	98	23	109
Pan B	109	217	216	191	24	198	21	196
Pan C	54	107	78	56	13	57	45	112
Pan D	110	219	138	106	22	136	33	221
Pan E	0	0	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3

TABLA 2

Resultados obtenidos de la cuantificación de gluten en los panes de maíz en los que se ha realizado diferentes extracciones, analizados mediante ELISA R5 Sándwich y ELISA R5 Competitivo. Resultados expresados en porcentaje de recuperación respecto del contenido teórico en función de las gliadinas añadidas

		ELISA R5 Sandwich				ELISA R5 Competitivo	
	Gluten teórico	Cocktail de extracción	Cocktail SDS	Etanol 60%	UPEX	Etanol 60%	UPEX
Pan A	100	93	90	14	91	19	101
Pan B	100	99	88	11	91	10	90
Pan C	100	73	52	12	53	42	105
Pan D	100	63	48	10	62	15	101

Ejemplo 2

Recuperación de la cantidad de gluten adicionada a muestras de alimentos (spiked samples)

5 Este ensayo se realizó para comprobar que la solución de extracción UPEX no inhibe ni afecta en el análisis. Para ello, se elaboraron una serie de “spiked samples” (muestras adicionadas) de alimentos para observar si tras el análisis por ELISA R5 Competitivo se recupera la totalidad del gluten añadido.

10 1.1. *Materiales*

- Alimentos: Se seleccionaron muestras de alimentos con cantidades de gluten inferiores al límite de detección de la técnica (3 ppm de gluten) y se añadió una cantidad conocida de gluten (“spiked simple”). Se eligieron alimentos con variedad de ingredientes y texturas para comprobar que este factor no afecte a los resultados.
- Soluciones: Se compararán los resultados del Cocktail de extracción con los del nuevo sistema de extracción UPEX.

20 1.2. *Métodos*

A cada muestra, previo al proceso de extracción, se le añadió una cantidad conocida de gluten (50 ppm o mg/kg). Posteriormente se realizó la extracción tal y como se ha descrito anteriormente y fueron analizadas por ELISA R5 Competitivo.

1.3. *Resultados*

30 En todos los casos se observa que la recuperación de gluten añadido es próxima al 100% por lo que se pone de manifiesto que la solución de extracción UPEX no afecta ni interfiere en el análisis y es la mejor de todas las ensayadas. Sin embargo, cuando se emplea el Cocktail de extracción, se producen resultados irreales ya que interfiere en el análisis dado lugar a artefactos y datos no cuantificables. De hecho, en la Tabla 3 se observa como el blanco da valores muy altos y por lo tanto indica que el análisis es erróneo.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 351 021 B1

TABLA 3

*Análisis de “spiked samples” de alimentos mediante ELISA R5 Competitivo.
Resultados expresados en porcentaje de recuperación de gluten*

Alimento	Recuperación (%)	Recuperación (%)
	UPEX	"Cocktail de extracción"
Aperitivo horneado	92	NC
Caldo de pollo	93	NC
Cereales en copos	102	NC
Embutido	94	NC
Flan	108	NC
Galletas de pastaflora	108	NC
Galletas sin gluten	110	NC
Harina panificable	109	NC
Jamón cocido	102	NC
Masa de pizza	107	NC
Natillas	95	NC
Pan de molde	104	NC
Papilla de cereales	101	NC
Patatas fritas	103	NC
Pimentón dulce	99	NC
Pipas tostadas sin sal	90	NC
Producto cárnico	106	NC
Tortitas de maíz	94	NC
Blanco	< 3	258

NC: No cuantificable

Ejemplo 3

Cuantificación de gluten en alimentos comerciales sometidos a distintos tratamientos durante su elaboración

1.1. *Materiales*

Se han analizado diferentes alimentos disponibles comercialmente, seleccionando aquellos que presentan diferente composición y textura, susceptibles de haber estado sometidos a diferentes tratamientos durante su elaboración.

1.2. *Métodos*

El procesado de las muestras y la extracción y análisis de gluten de las mismas se ha realizado de forma similar a lo explicado en los ejemplos anteriores.

1.3. *Resultados*

- En alimentos tratados con calor e hidrolizados se observa que los valores obtenidos al emplear la solución de extracción UPEX y análisis por ELISA R5 Competitivo son superiores respecto a las otras soluciones de extracción, ya que la combinación de esta nueva solución de extracción con esta técnica, es la única capaz de extraer y cuantificar la totalidad del gluten presente de forma hidrolizada en alimentos tratados con calor.
- En los alimentos no tratados con calor e hidrolizados los resultados obtenidos con UPEX son similares a los obtenidos tras extraer con Etanol 60% y cuantificar con ELISA R5 Competitivo.
- En los alimentos que no están tratados con calor y no están hidrolizados los resultados de UPEX son similares a los de Etanol 60% y Cocktail de extracción.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 351 021 B1

TABLA 4

Resultados obtenidos de la cuantificación de gluten en alimentos disponibles comercialmente realizando diferentes extracciones y cuantificando mediante ELISA R5 Sándwich y Competitivo. Resultados expresados en ppm de gluten

5

	PRODUCTO	ELISA R5 Sandwich			ELISA R5 Competitivo	
		Cocktail	UPEX	Etanol 60%	UPEX	Etanol 60%
10	Alimento infantil	25	26	10	35	8
	Almidón de maíz	102	115	93	120	80
	Arroz con miel	3	3	< 3	3	< 3
15	Cacao soluble	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Caldo de pollo	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Cereales en copos	< 3	3	< 3	4	3
20	Cerveza A	ND	ND	ND	64	63
	Cerveza B	ND	ND	ND	72	70
	Cerveza C	ND	ND	ND	56	55
	Cerveza D	ND	ND	ND	49	42
25	Cerveza E	ND	ND	ND	30	25
	Cerveza F	ND	ND	ND	34	29
	Chorizo/Longaniza	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
30	Colorante	4	5	3	3	3
	Embutido	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Fideos de arroz	11	14	8	10	9
35	Flan	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Galletas A	20	15	8	24	5
	Galletas B	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Galletas C	< 3	< 3	< 3	5	5
40	Galletas D	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Galletas E	2	< 3	< 3	< 3	4
	Galletas F	< 3	< 3	< 3	4	3
45	Galletas G	< 3	< 3	< 3	3	< 3
	Galletas H	3	4	3	8	5
	Galletas cacao	< 3	3	< 3	5	3
50	Harina panificable	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Jamón cocido	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Magdalenas	< 3	< 3	< 3	6	3
	Masa de pizza	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
55	Masa semielaborada	18	32	15	93	74
	Mayonesa	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Mortadela	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
60	Natillas	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3

65

ES 2 351 021 B1

TABLA 4 (continuación)

5	PRODUCTO	ELISA R5 Sandwich			ELISA R5 Competitivo	
		Cocktail	UPEX	Etanol 60%	UPEX	Etanol 60%
	Pan	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
10	Pan de molde	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Pan rallado	19	23	6	41	7
	Pan rallado	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
15	Papilla de cereales A	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Papilla de cereales B	8	7	5	8	4
	Pasta A	238	203	89	146	72
	Pasta B	8	13	7	11	3
20	Pasta C	24	35	16	27	14
	Pasta D	30	40	9	48	8
	Pasta E	56	56	20	37	23
25	Pasta F	13	26	8	36	10
	Pasta G	22	29	14	20	6
	Pastas	10	3	< 3	6	3
30	Patatas fritas	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
	Producto bollería A	7	8	6	9	6
	Producto bollería B	178	209	70	138	124
35	Producto bollería C	4	5	2	9	2
	Producto bollería D	13	16	9	20	8
	Producto cárnico	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
40	Tortitas de maíz	< 3	< 3	< 3	3	4

ND: No determinado

Ejemplo 4

Análisis de gluten por Western blot R5 en alimentos comerciales sometidos a distintos tratamientos durante su elaboración

En este ensayo se demuestra que el nuevo sistema de extracción objeto de la invención es compatible también con la técnica de Western blot R5 directamente sin necesidad de realizar precipitaciones o lavados como ocurre con los otros sistemas de extracción disponibles en la actualidad.

1.1. Materiales

- Alimentos: Se han analizado diferentes alimentos disponibles comercialmente, seleccionado aquellos que presentan diferente composición y textura, susceptibles de haber estado sometidos a diferentes tratamientos durante su elaboración.
- Soluciones: Para extraer el gluten de las muestras se ha empleado la nueva solución de extracción UPEX así como Etanol 60% para comparar los resultados. Además se empleará el Cocktail-SDS directamente para poner de manifiesto que no es adecuado para este tipo de análisis.

1.2. Métodos

Las muestras se procesan de forma similar a lo explicado en los ejemplos anteriores. Posteriormente se extraen en cada caso con la solución UPEX, Etanol 60% o Cocktail-SDS siguiendo también el protocolo expuesto.

En un Speed-Vac modelo Unijet II a 37°C se seca una cantidad adecuada de los extractos obtenidos en función del contenido en gluten de la muestra. Así, cuanto mayor sea el contenido en gluten menor cantidad de extracto se secará y por el contrario cuanto menor sea el contenido en gluten mayor cantidad de extracto se secará para que se aprecien las bandas inmunoreactivas correctamente. La cantidad a secar del extracto de muestra suele estar en un intervalo entre 10-300 µl. El tiempo que tarda en secarse variará también en función de la cantidad de extracto y puede ser de 40-90 minutos.

Una vez seco el extracto se añaden 20 µl de tampón de carga de electroforesis, se cierra el tubo y se agita vigorosamente durante 1 minuto; después se hierve a 100°C en un bloque térmico durante 5 minutos y se centrifuga 1 minuto a 2.500 g. Una vez finalizado este proceso se cargan los 20 µl de tampón de carga de electroforesis que contienen la muestra en un gel SDS-PAGE y se procede a la electroforesis a 25 mA durante 90-120 minutos.

La diferencia de este método respecto al del Cocktail-SDS radica en que cuando la muestra tiene un bajo contenido en gluten y por tanto hay que secar y cargar en el gel una gran cantidad de muestra, las sales del SDS interfieren en la electroforesis y no permite que las proteínas puedan migrar adecuadamente, apareciendo distorsiones en el gel y por tanto en las bandas de proteínas. Para solventar este problema cuando se emplea Cocktail-SDS es necesario, previo al proceso de secado de la muestra, hacer una serie de precipitaciones en frío empleando nieve carbónica. Este proceso supone un mayor tiempo en el análisis y además existe mayor riesgo de que parte de las proteínas de interés precipite conjuntamente con las sales y por tanto el resultado del análisis no refleje la totalidad del contenido en gluten. Por lo tanto, esto supone una gran desventaja para el método.

Por el contrario, con el empleo del nuevo sistema UPEX no es necesario realizar ningún tratamiento previo ya que los reactivos que lo componen no afectan ni interfieren en el correcto desarrollo de la electroforesis en los geles por lo que, además de ser un proceso más rápido, se evitan las posibles pérdidas de las proteínas de interés.

1.3. Resultados

Como se observa en la figura 3, se aprecian claramente las bandas inmunoreactivas correspondientes a prolaminas de trigo, cebada o centeno y no hay ningún tipo de deformación en los geles de acrilamida.

En la figura 3 aparecen reflejados los valores de gluten obtenidos tras el análisis por ELISA R5 Competitivo y en función de este dato la cantidad necesaria a cargar en el gel.

En la figura 4 Se observa que las bandas son similares comparando extracción con UPEX con EtOH 60% indicando que los reactivos que componen la solución UPEX no interfieren ni afectan a la electroforesis por lo que no se producen deformaciones en el gel. Además, con UPEX se observa que, cargando la misma cantidad de una muestra en un gel u otro, las bandas son más intensas que con etanol 60% ya que se extrae una mayor cantidad de gluten.

En la figura 5 se observa que al emplear el "Cocktail de extracción-SDS" para el análisis por Western blot, no se produce una correcta electroforesis debido a la interferencia por parte de las sales al cargar una gran cantidad de extracto y por tanto, el gel se deforma y no se observan claramente las bandas de proteínas de cada muestra. Así, se pone de manifiesto la necesidad de utilizar la nueva solución objeto de la patente.

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende:

- a) tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o una sal de la misma,
- b) N-Lauroilsarcosina o una sal de la misma, y
- c) un tampón

y que se encuentra a un pH de entre 7 y 8.

2. Composición según la reivindicación 1, en la que la tris(2-carboxietil)fosfina o su sal se encuentra a una concentración de entre 2 mM y 5 mM.

3. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la N-Lauroilsarcosina o su sal se encuentra en una proporción de entre el 1% y el 6% peso/volumen.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el tampón se selecciona de la lista que comprende: Tris-Clorhídrico o PBS.

5. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la extracción de gluten de una muestra.

6. Uso según la reivindicación 5, donde la muestra es un alimento.

7. Preparación combinada para su uso en la extracción de gluten de una muestra que comprende:

- a) tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) o una sal de la misma,
- b) N-Lauroilsarcosina o una sal de la misma, y
- c) un tampón.

8. Preparación combinada para su uso en la extracción de gluten de una muestra según la reivindicación 7, en la que la tris(2-carboxietil)fosfina o su sal se encuentra a una concentración de entre 2 mM y 5 mM.

9. Preparación combinada para su uso en la extracción de gluten de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, en la que la N-Lauroilsarcosina o su sal se encuentra en una proporción de entre el 1% y el 6% volumen/volumen.

10. Preparación combinada para su uso en la extracción de gluten de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde el tampón se selecciona de la lista que comprende: Tris-Clorhídrico y PBS.

11. Preparación combinada para su uso en la extracción de gluten de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, donde la muestra es un alimento.

12. Método de extracción de gluten de una muestra que comprende:

- a) añadir a la muestra la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4,
- b) incubar el producto resultante del paso (a),
- c) añadir al producto resultante del paso (b) una solución acuosa de etanol,
- d) incubar el producto resultante del paso (c), y
- e) separar del producto resultante del paso (d) el sobrenadante que contiene el gluten extraído.

13. Método de extracción de gluten de una muestra según la reivindicación 12, donde en el paso (a) la relación de peso:volumen muestra:composición es de entre 1:5 y 1:20.

14. Método de extracción de gluten de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde en el paso (b) se incuba a una temperatura de entre 18 y 25°C durante un periodo de tiempo de entre 40 min y 90 min.

ES 2 351 021 B1

15. Método de extracción de gluten de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde en el paso (b) se incuba a una temperatura de entre 40 y 60°C durante un periodo de tiempo de entre 10 min y 50 min.

16. Método de extracción de gluten de una muestra según la reivindicación 12, donde entre el paso (b) y el paso (c) comprende un paso adicional en el que el producto resultante del paso (b) se enfría a una temperatura de entre 18°C y 25°C.

17. Método de extracción de gluten de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, donde el etanol se encuentra en una proporción de entre el 40% y el 70% del volumen total del producto resultante del paso (c) del método de la invención.

18. Método de extracción de gluten de una muestra según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 17, donde en el paso (d) se incuba a una temperatura de entre 18°C y 25°C durante un periodo de tiempo de entre 30 min y 70 min.

19. Método de extracción de gluten de una muestra según la reivindicaciones 12 a 18, donde la separación del paso (e) comprende la centrifugación de la muestra.

20. Método de extracción de gluten de una muestra según la reivindicación 19 donde la centrifugación de la muestra se realiza a una velocidad de giro de entre 2000 y 4000 g durante un periodo de tiempo de entre 5 min y 20 min.

21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, donde la muestra es un alimento.

22. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21 que comprende:

- la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y
- etanol.

23. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21 que comprende:

- la preparación combinada según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, y
- etanol.

24. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 22 o 23 donde el etanol se encuentra en solución acuosa.

FIG. 1

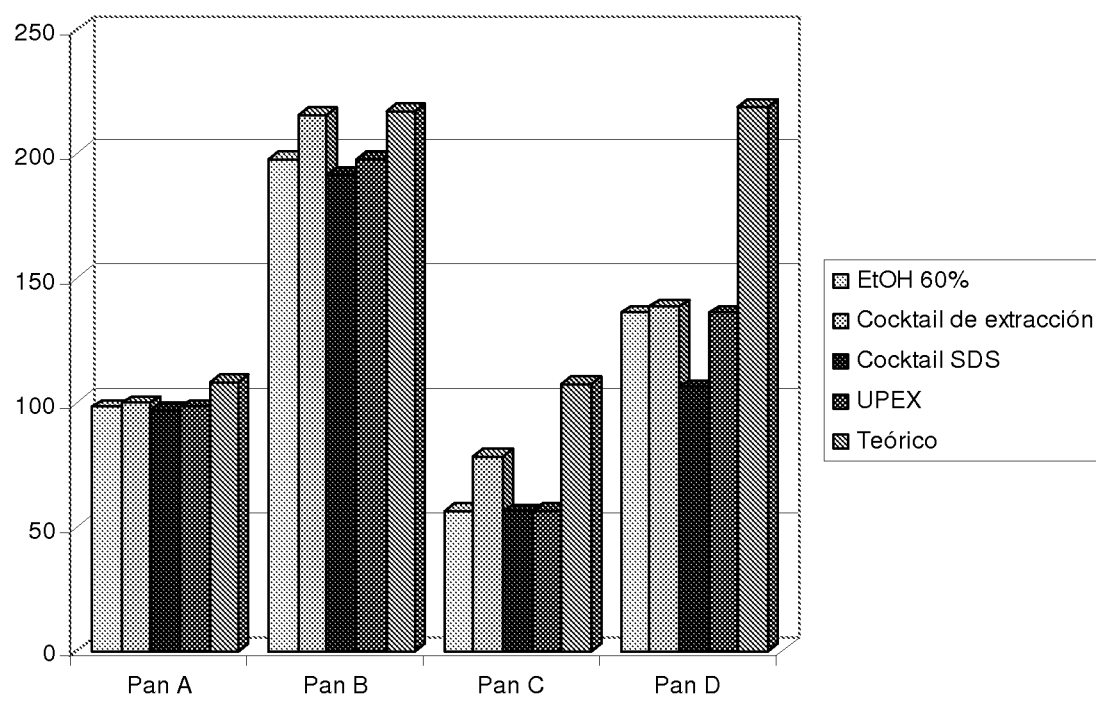


FIG. 2

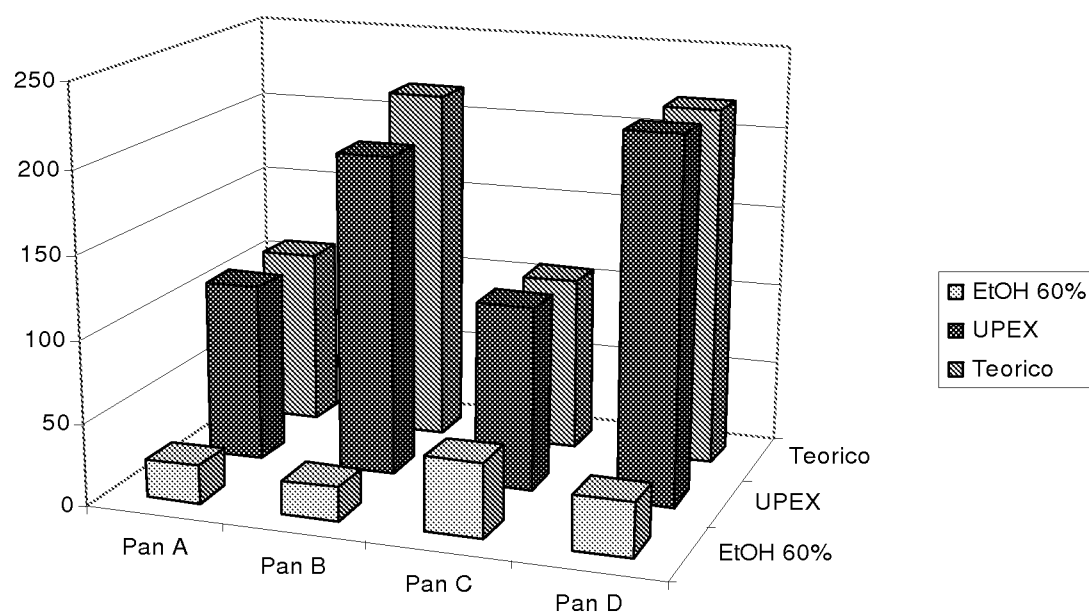


FIG. 3

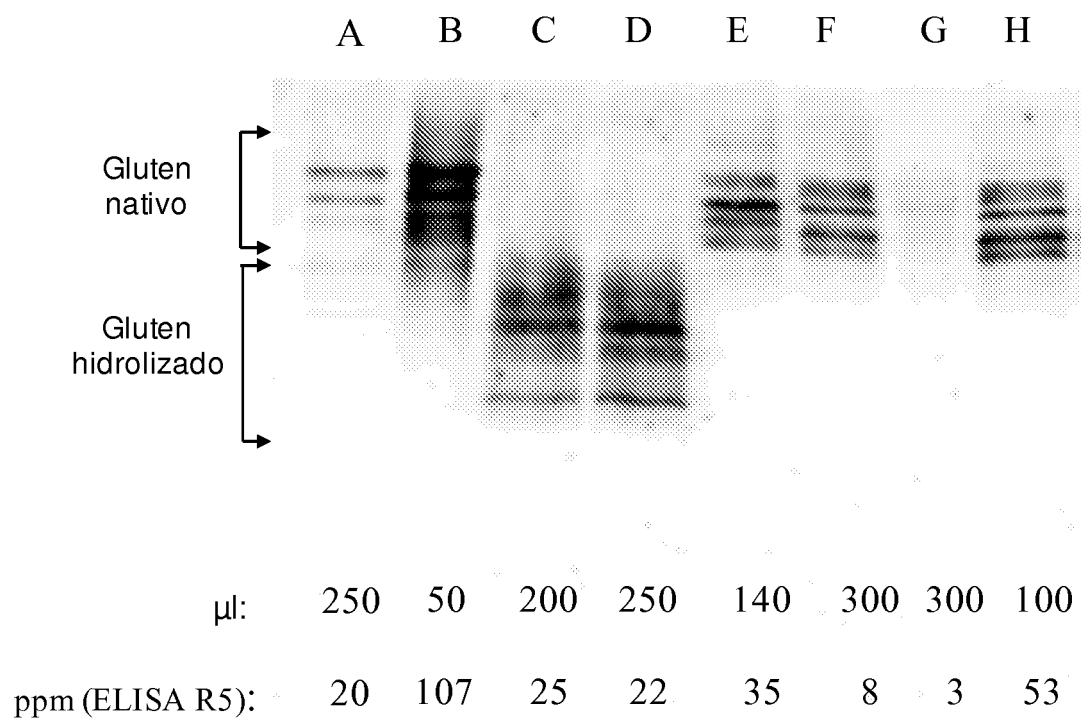
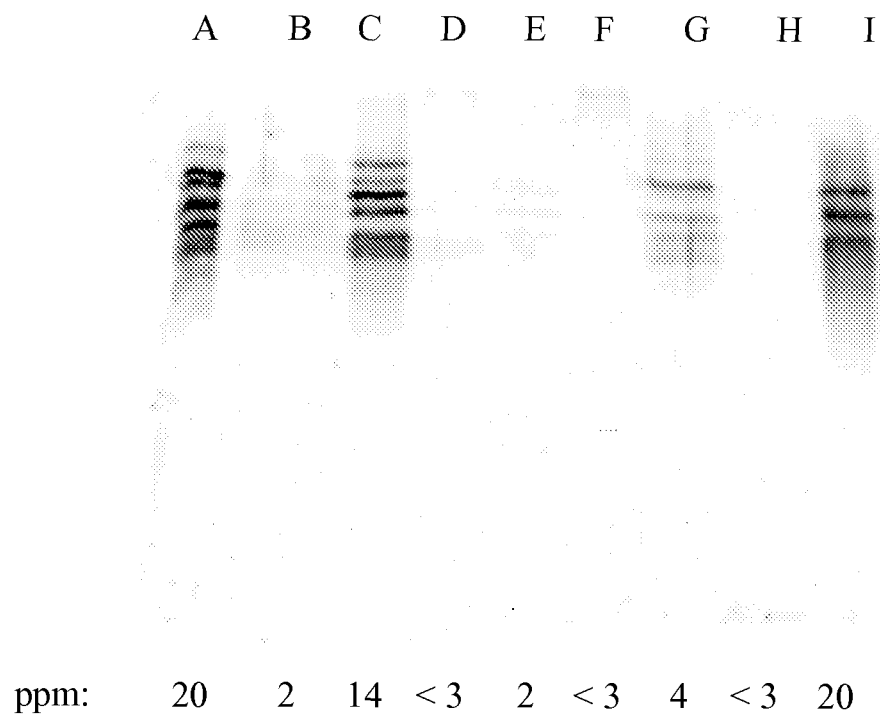


FIG. 4

A.



B.

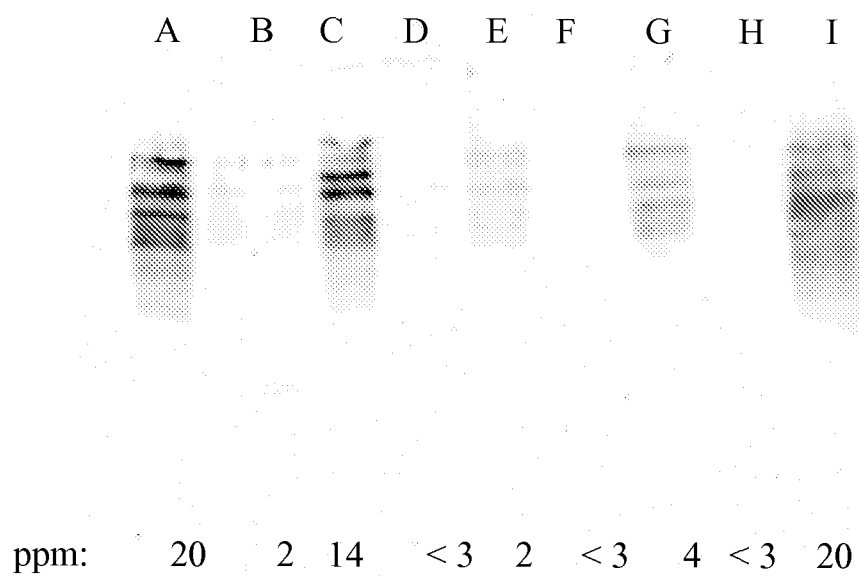
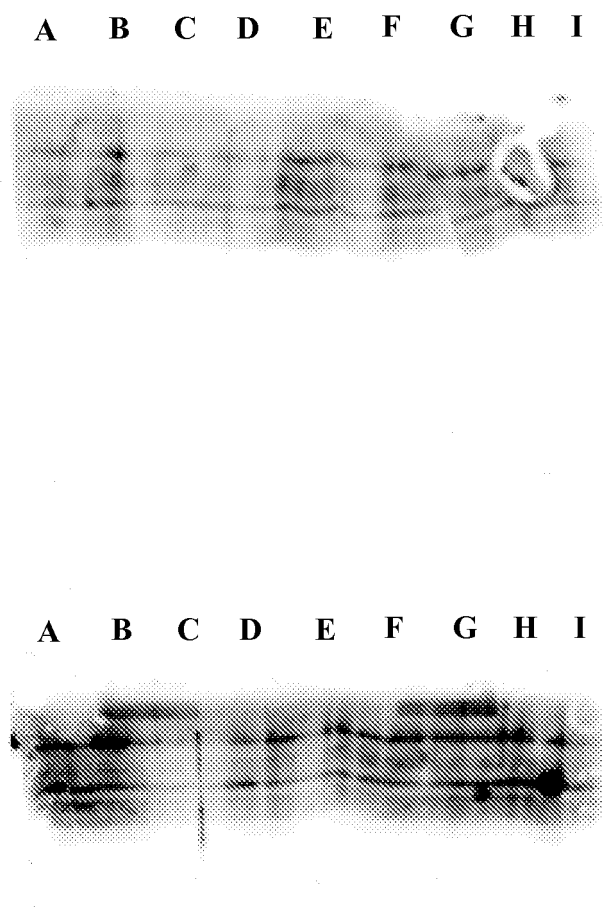


FIG. 5





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930445

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/02** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 2003448 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 17.12.2008, párrafos 0008-0014, 0021-0023, 0026-0031.	1-24
X	ES 2182698 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.03.2003, página 3, líneas 28-62; página 5, línea 53 – página 6, línea 5.	1-24
A	BURNS et al. Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine. J. Org. Chem. 1991, vol. 56, pp. 2648-2650.	1-11
A	WROBLEWSKI et al. Solubilization of Spiroplasma citri cell membrane proteins with the anionic detergent lauroyl-sarcosinate (sarkosyl) Biochimie, 1978, vol. 60, pp. 389-398.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.12.2010

Examinador
J. López Nieto

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 20.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-24	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-24	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 2003448 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)	17.12.2008
D02	ES 2182698 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS)	01.03.2003
D03	BURNS et al. Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine. J. Org. Chem. 1991, vol.56, pp.2648-2650.	
D04	WROBLEWSKI et al. Solubilization of Spiroplasma cell membrane proteins with the anionic detergent lauroyl-sarcosinate (sarkosyl) Biochimie, 1978, vol.60, pp.389-398	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a:

-Una composición que comprende tris(2-carboxietil)fosfina(TCEP) o una sal de la misma; N-laurilsarcosina o una sal de la misma y un tampón (reiv.1-4)

-Uso de la composición para la extracción de gluten de una muestra, que puede ser un alimento (reiv.5-6)

-Preparación combinada para su uso en la extracción de gluten de una muestra que comprende la composición anterior (reiv. 7-11)

-Método de extracción de una muestra de gluten (reiv.12-21)

-Kit para llevar a cabo el método de extracción (reiv.22-24)

En el estado de la técnica no se han encontrado composiciones que contengan los componentes concretos que se reivindican por lo tanto la invención según las reivindicaciones 1-24 cumple el requisito de novedad.

Sin embargo, la invención no cumple el requisito de actividad inventiva por los siguientes motivos:

Además del tampón, los ingredientes de la composición objeto de la solicitud son un agente reductor de puentes disulfuro (TCEP) y un detergente (N-Lauroilsarcosina) o sarkosyl. Ambos ingredientes son de conocimiento general en el estado de la técnica (D03 y D04).

Por otra parte, las composiciones a base de un tampón, un agente reductor de puentes disulfuro y detergente para la extracción de gluten de alimentos son conocidas en el estado de la técnica (D01, par.0008-0014; D02, pág.3, lín.28-62) Sería obvio para un experto en la materia la posibilidad de sustituir el agente reductor y el detergente citados en D01 o D02 por otros conocidos en el estado de la técnica (D03 y D04) probando diversas proporciones hasta conseguir el resultado deseado, lo cual no implica actividad inventiva. Así pues, las reivindicaciones 1-11 no cumplen el requisito de actividad inventiva.

El método de extracción de gluten de la invención sigue los mismos pasos que los métodos divulgados por D01(par.0021-0023) o D02 (pág. 5, lín.53-pág.6, lín.5). En el documento D01 también se da a conocer un kit para llevar a cabo el método de extracción de gluten en el que se incluyen la composición de extracción y etanol (par.0026-0031). Por lo tanto, teniendo en cuenta el estado de la técnica divulgado por D01 o D02, las reivindicaciones 12-24 carecen de actividad inventiva.