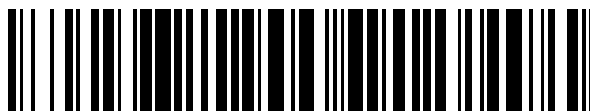


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 621**

51 Int. Cl.:
A23C 9/13 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A23L 2/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08156298 .5**
96 Fecha de presentación: **15.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2123177**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **Composición prefibrilar y fibrillas de materiales proteicos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2012

73 Titular/es:
Friesland Brands B.V.
Stationsplein 4
3818 LE Amersfoort, NL

72 Inventor/es:
Akkermans, Cynthia;
Schokker, Erik Peter;
Paques, Marcel;
Nieuwenhuijse, Johannes Andries;
Zijtveld-van der Wiel, Johanna Henriëtte;
Venema, Paul y
Goot, Atze Jan van der

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 385 621 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

Composición prefibrilar y fibrillas de materiales proteicos

5 [0001] La invención se refiere a la producción de fibrillas a partir de materiales proteicos tales como los obtenidos a partir de proteína de lactosuero. En particular, la invención se refiere a la producción de fibrillas a partir de material proteico obtenido de una β -lactoglobulina, glicinina o patatina.

10 [0002] Como se describe en el documento WO 2004/049819, la β -lactoglobulina se puede someter a un proceso dando como resultado fibrillas. El proceso comprende la disolución de la β -lactoglobulina en ácido clorhídrico acuoso, dilución y filtrado repetido de la solución de proteína, y sometimiento de la solución resultante a temperatura elevada (p.ej. 80 °C) durante un periodo prolongado de tiempo (p. ej. 10 horas). Tal y como se describe en el documento WO 2004/049819, este proceso da como resultado que la proteína se agrega en fibrillas. Estas fibrillas se pueden usar como un aditivo en un amplio espectro de productos alimentarios y no alimentarios, donde las fibrillas pueden tener diferentes funciones variables, tales como la estabilización de la espuma, la mejora de la capacidad higroscópica y/o textura en la carne o productos tipo carne, propiedades de textura generales incluyendo la mejora de la viscosidad, mejora de la capacidad de gelificación. En general, las fibrillas tienen propiedades funcionales mejoradas comprendiendo capacidad espesante, capacidad de gelificación, capacidad de formación de espuma, y capacidad emulsionante. Estas mejoras son descritas con referencia a la misma proteína en la misma concentración, pero no sometida al proceso mencionado anteriormente.

20 [0003] Será aparente que no se desea una textura fibrilar per se para todas las propiedades funcionales mejoradas de las fibrillas proteicas del documento WO 2004/049819. Además, en la producción de muchos de estos productos no es deseable para el fabricante, o la persona que combina los ingredientes dando lugar a los productos, llevar a cabo el proceso descrito anteriormente antes de poner el aditivo en un producto. En muchos de estos casos, se prefirió un aditivo listo para usar, disponible p. ej. como un polvo seco, antes que la preparación in situ de fibrillas proteicas a partir de proteínas usando el proceso mencionado anteriormente.

30 [0004] Sería deseable, sin detracción de las posibilidades funcionales proporcionadas por las fibrillas mismas, poner a disposición funcionalidades similares en un proceso que no requiere calentamiento durante un periodo prolongado de tiempo. También puede ser deseable proporcionar un producto intermedio que se puede almacenar y enviar, p. ej. como un polvo, y que es capaz de ser transformado en fibrillas en un momento elegido. Otro deseo a este aspecto es proporcionar un ingrediente que se puede restituir en polvo a partir de una solución de viscosidad relativamente baja. También se desearía proporcionar un proceso en el que los dos aspectos de las fibrillas descritas anteriormente, es decir, propiedades funcionales y naturaleza fibrilar, se pudieran realizar en pasos separados de proceso, o al menos en partes separadas de un proceso. Preferentemente sería deseable que, seleccionando las condiciones, la composición definitiva y la funcionalidad de la composición proteica y las fibrillas formadas a partir de ella, pudieran ser hechas a medida.

40 [0005] Con el objetivo de hacer frente a uno o más de estos objetivos, la invención, en un aspecto, proporciona una composición prefibrilar peptídica obtenible por la hidrólisis de una proteína seleccionada del grupo consistente en preparación de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina, preparación de proteína de soja con glicinina, patatina, y mezclas de las mismas, donde la hidrólisis se lleva a cabo en condiciones ácidas a temperatura elevada. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para fabricar una composición prefibrilar peptídica, comprendiendo la provisión de una solución de una proteína como se ha descrito anteriormente en un solvente acuoso ácido, y el calentamiento de la solución en condiciones de inhibición de formación de fibrillas. En otro aspecto, la invención proporciona una variedad de usos de las composiciones peptídicas prefibrilares, incluyendo usos en los que la composición prefibrilar se convierte en fibrillas en un producto final que puede ser usado entonces como se describe en el documento WO 2004/049819, y usos en los que la composición prefibrilar per se está contenida en producto final, p. ej. con el objetivo de formar fibrillas (agregación fibrilar) con el uso o consumo del producto final. En una forma de realización particular del último aspecto de la invención, la composición prefibrilar se usa en un alimento dietético para el control de peso corporal humano o animal.

55 [0006] En cuanto a las condiciones mencionadas, la temperatura elevada generalmente significa una temperatura superior a 20 °C, preferiblemente de 35 °C a 140 °C, y más preferiblemente de 80 °C a 120 °C. Las condiciones ácidas pueden referirse a cualquier pH ácido, pero preferiblemente un pH ácido relativamente fuerte, de 0.5 a 4, más preferiblemente de 0.5 a 3, y de la forma más preferible de 1 a 2. Una temperatura más alta, superior a 80 °C, y más preferiblemente superior a 100 °C, es particularmente preferida en vistas a la posibilidad de separar la hidrólisis de la formación fibrilar, ya que una temperatura más alta llevará a una velocidad de hidrólisis mayor.

60 [0007] Otras referencias del estado de la técnica que se refieren a someter proteínas tales como beta-lactoglobulina, glicinina de soja, y aislado de proteína de soja a hidrólisis ácida, y que discuten la formación de fibrillas, son:

- Akkermans y colaboradores, "Shear Pulses Nucleate Fibril Aggregation", *Food Biophysics*, Kluwe Academic Publishers-Plenum Publishers, NE, vol.1, n.º 3, 23 de mayo de 2006, páginas 144-150;

65

- Akkermans y colaboradores; *Biomacromolecules*, vol.9, n.º 5, 17 de abril de 2008, páginas 1474-1479;
- Akkermans y colaboradores; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.55; n.º 24, 30 de octubre de 2007, páginas 9877-9882;

[0008] Una referencia general en la agregación de proteínas es van der Linden y colaboradores; *Current Opinion in Colloid And Interface Science*, vol.12, n.º 4-5, 2007, páginas 158-165;

[0009] Madsen y colaboradores; *Journal of Food Science*, vol.62; n.º 3, 1997, páginas 579-582 proporciona estado de la técnica de una proteasa de serina aislada que se escinde preferiblemente en el sitio carboxílico de residuos de ácido aspártico o glutámico para uso en la hidrolización de beta-lactoglobulina.

[0010] El documento WO 2008/088472 es una solicitud de patente presentada anteriormente que se refiere a hidrólisis enzimática de beta-lactoglobulina que usa una endopeptidasa que se escinde preferiblemente en un residuo de ácido aspártico o glutámico. Se añade una condición a la reivindicación 1 con respecto a esta referencia.

[0011] El documento JP 08/070866 proporciona un estado de la técnica que se refiere a la síntesis microbiana de beta-lactoglobulina. Otra referencia de este tipo es Hazebrouck y colaboradores; *Microbial Cell Factories, Biomed Central*, vol.6, n.º 1, 6 de abril de 2007, página 12 .

[0012] Sin desear estar ligado a una teoría, los presentes inventores creen que otras fibrillas a parte de las sugeridas en la técnica, las denominadas de β -lactoglobulina, no están hechas realmente de moléculas de proteína de β -lactoglobulina como bloque de construcción, si no que están hechas de componentes peptídicos derivados de la β -lactoglobulina. Esta nueva apreciación en la naturaleza de las fibrillas proteicas mencionadas anteriormente abre el amplio ámbito de posibilidades útiles ofrecidas ahora por la invención. De forma similar, se descubrió que las fibrillas de proteína de soja y proteína de patata están compuestas de péptidos.

[0013] Particularmente, en virtud de la formación de péptidos, se puede definir un paso intermedio en el proceso mencionado anteriormente, es decir, un paso en el que la hidrólisis ha sucedido de una forma suficiente para formar las unidades estructurales peptídicas para las fibrillas, pero aún no las fibrillas mismas. Esto se conoce como una "composición prefibrilar."

[0014] La invención proporciona un método para fabricar una composición prefibrilar peptídica mediante la hidrólisis de una proteína seleccionada del grupo consistente en preparación de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina, preparación de proteína de soja con glicinina, patatina, y mezclas de las mismas, comprendiendo el método el sometimiento de la proteína a hidrólisis enzimática, con la condición de que la composición prefibrilar peptídica no sea un hidrolizado comprendiendo una proteína de leche que incluye beta lactoglobulina hidrolizada con al menos una enzima proteolítica que se escinde preferentemente en un residuo de ácido glutámico o de ácido aspártico, y donde el hidrolizado se enriquece en uno o más de los péptidos AQSAPLRVYVE, ILLQKWE, KTKIPAVFKID, o KTKIPAVFKIDALNE.

[0015] La invención puede ser realizada en base a preparaciones de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina, es decir, una composición comprendiendo proteína de lactosuero, comprendiendo la proteína de lactosuero β -lactoglobulina. Las proteínas de lactosuero se pueden describir como aquellas proteínas de leche que permanecen después de cuajarse la leche, es decir, precipitación de caseína, generalmente con la adición de cuajo a leche de quesería. El término "proteína de lactosuero" se usa a veces para indicar la composición completa de proteína de lactosuero, pero normalmente indica cualquier proteína o combinación de proteínas presentes en el lactosuero. La invención se refiere a cualquiera y a todas las composiciones de proteína de lactosuero comprendiendo β -lactoglobulina, que es una de las proteínas de lactosuero principales. Preferiblemente, la preparación de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina con el aislado de proteína de suero, comprendiendo una fracción sustancial (preferiblemente basada en el total del material, de al menos 50%, y más preferiblemente al menos 80%) de β -lactoglobulina, y más preferiblemente es β -lactoglobulina misma.

[0016] La invención también puede realizarse en base a glicinina (proteína de soja) o patatina (proteína originada de elementos de la familia vegetal *Solanaceace*, tal como proteína de patata).

[0017] La composición prefibrilar puede comprender un amplio intervalo de fragmentos peptídicos de varios pesos moleculares, generalmente entre 1,000 y 10,000 Da y consiste preferiblemente en fragmentos peptídicos con pesos moleculares entre 2,000 y 8,000 Da. Con respecto a las fibrillas de proteína de lactosuero se prefiere que la composición prefibrilar comprenda, como fragmento dominante, es decir, el fragmento que de todos los fragmentos está más presente, definido por los aminoácidos n.º 12 a 32 (f_{12-33}) de β -lactoglobulina, es decir, IQKVAGTWYSLAMAASDISLL. Este fragmento puede estar presente como tal, como parte de fragmentos más grandes, o ambos. Preferiblemente los siguientes péptidos:

f_{12-32} IQKVAGTWYSLAMAASDISLL

ES 2 385 621 T3

| | | |
|----|---------------------|--|
| | f ₁₂₋₃₃ | IQKVAGTWYSLAMAASDISLLD |
| | f ₁₁₋₃₂ | DIQKVAGTWYSLAMAASDISLL |
| | f ₁₁₋₃₃ | DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLD |
| 5 | f ₁₋₃₂ : | LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLL |
| | f ₁₋₃₃ : | LTVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLD |
| | f ₁₋₂₇ | LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAAS |
| | f ₁₋₂₈ | LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASD |
| | f ₁₂₋₆₄ | IQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWEND |
| | f ₁₁₋₆₃ | DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWEN |
| 10 | f ₁₁₋₆₄ | DIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGDLEILLQKWEND |

[0018] El fragmento está presente preferiblemente, tal y como se define anteriormente, en una medida de más de 40% de todos los péptidos presentes.

15 [0019] La composición peptídica comprende preferiblemente además uno o más de los siguientes péptidos:

| | | |
|----|----------------------|---|
| | f ₁₋₅₂ : | LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEG |
| | f ₁₋₅₃ : | LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLAMAASDISLLDAQSAPLRVYVEELKPTPEGD |
| | f ₁₃₈₋₁₆₂ | KALKALPMHIRLSFNPTQLEEQCHI |
| 20 | f ₉₉₋₁₂₈ | YKKYLLFCMENSAEPEQSLACQCCLVRTPEV |
| | f ₉₉₋₁₂₉ | YKKYLLFCMENSAEPEQSLACQCCLVRTPEVD |
| | f ₉₈₋₁₂₈ | DYKKYLLFCMENSAEPEQSLACQCCLVRTPEV |
| | f ₉₇₋₁₂₈ | TDYKKYLLFCMENSAEPEQSLACQCCLVRTPEV |

25 [0020] Otras características preferidas de la composición prefibrilar peptídica obtenible de esta forma, es que la mayoría de los fragmentos peptídicos resultan de la escisión de los enlaces peptídicos antes o después del ácido aspártico. La composición prefibrilar peptídica se caracteriza además, preferiblemente, por comprender los péptidos más hidrofóbicos obtenibles a partir de la hidrólisis de la preparación de proteína con β -lactoglobulina, mediante una carga baja con pH 2, y por la ausencia de prolina.

30 [0021] Está previsto además enriquecer la composición peptídica (p. ej. por fraccionamiento) con respecto a los péptidos mencionados anteriormente, y preferiblemente con respecto a f₁₂₋₃₃.

35 [0022] De forma similar, fragmentos de péptido de formación de fibrillas preferidos basados en glicinina y patatina se basan en lo siguiente:

Glicinina G1

40 [0023] Número de acceso: P04776

| | | |
|----|----------------------|--|
| | f ₄₂₋₁₂₈ | DNRIESEGGLIETWNPNNKPFQCAGVALSRCTLNARNALRRPSYTNQP QEIIYQQGKGFMIYPGCPSTFEEPQQPQQRGQSSRPQD |
| | f ₄₂₋₁₂₇ | DNRIESEGGLIETWNPNNKPFQCAGVALSRCTLNARNALRRPSYTNQP QEIIYQQGKGFMIYPGCPSTFEEPQQPQQRGQSSRPQ |
| 45 | f ₄₃₋₁₂₈ | NRIESEGGLIETWNPNNKPFQCAGVALSRCTLNARNALRRPSYTNQP EIIYQQGKGFMIYPGCPSTFEEPQQPQQRGQSSRPQD |
| | f ₄₃₋₁₂₇ | NRIESEGGLIETWNPNNKPFQCAGVALSRCTLNARNALRRPSYTNQP EIIYQQGKGFMIYPGCPSTFEEPQQPQQRGQSSRPQ |
| | f ₁₂₈₋₁₄₀ | DRHQKIYNFREGD |
| 50 | f ₁₂₈₋₁₃₉ | DRHQKIYNFREG |
| | f ₁₂₉₋₁₄₀ | RHQKIYNFREGD |
| | f ₁₂₉₋₁₃₉ | RHQKIYNFREG |
| | f ₁₄₀₋₁₅₇ | DLIAVPTGVAWWMYNNED |
| | f ₁₄₀₋₁₅₆ | DLIAVPTGVAWWMYNNNE |
| 55 | f ₁₄₁₋₁₅₇ | LIADVPTGVAWWMYNNED |
| | f ₁₄₁₋₁₅₆ | LIADVPTGVAWWMYNNNE |
| | f ₁₅₇₋₁₆₇ | DTPVAVSIIID |
| | f ₁₅₇₋₁₆₆ | DTPWAVSII |
| | f ₁₅₈₋₁₆₇ | TPVAVSIIID |
| 60 | f ₁₅₈₋₁₆₆ | TPVAVSII |
| | f ₁₇₆₋₂₃₆ | DQMPRRFYLAGNQEFLKYQQEQGGHQSQKKGKHQQEEENEGGSI LSGFTLEFLEHAFSVD |
| | f ₁₇₆₋₂₃₅ | DQMPRRFYLAGNQEFLKYQQEQGGHQSQKKGKHQQEEENEGGSI LSGFTLEFLEHAFSV |
| | f ₁₇₇₋₂₃₆ | QMPRRFYLAGNQEFLKYQQEQGGHQSQKKGKHQQEEENEGGSIL SGFTLEFLEHAFSVD |
| | f ₁₇₇₋₂₃₅ | QMPRRFYLAGNQEFLKYQQEQGGHQSQKKGKHQQEEENEGGSIL SGFTLEFLEHAFSV |
| 65 | f ₂₅₁₋₂₇₀ | DKGAIIVTKGGLSVIKPPTD |
| | f ₂₅₁₋₂₆₉ | DKGAIIVTKGGLSVIKPPT |

f₂₅₂₋₂₇₀ KGAIIVTKGGLSVIKPPTD
 f₂₅₂₋₂₆₉ KGAIIVTKGGLSVIKPPT
 f₃₁₃₋₃₃₂ DETICTMRLRHNIQTSSPD
 f₃₁₃₋₃₃₁ DETICTMRLRHNIQTSSP
 5 f₃₁₄₋₃₃₂ ETICTMRLRHNIQTSSPD
 f₃₁₄₋₃₃₁ ETICTMRLRHNIQTSSP
 f₃₃₂₋₃₄₈ DIYNPQAGSVTTATSLD
 f₃₃₂₋₃₄₇ DIYNPQAGSVTTATSL
 f₃₃₃₋₃₄₈ IYNPQAGSVTTATSLD
 10 f₃₃₃₋₃₄₇ IYNPQAGSVTTATSL
 f₃₄₈₋₄₀₃ DFPALSWLRLSAEFGSLRKNAMFVPHYNLNANSIIYALNGRALIQVV NCNGERVFD
 f₃₄₈₋₄₀₂ DFPALSWLRLSAEFGSLRKNAMFVPHYNLNANSIIYALNGRALIQVV NCNGERVF
 f₃₄₉₋₄₀₃ FPALSWLRLSAEFGSLRKNAMFVPHYNLNANSIIYALNGRALIQVVN CNGERVFD
 f₃₄₉₋₄₀₂ FPALSWLRLSAEFGSLRKNAMFVPHYNLNANSIIYALNGRALIQVVN CNGERVF
 15 f₄₀₃₋₄₂₇ DGELQEGRVLIVPQNFVVAARSQSD
 f₄₀₃₋₄₂₆ DGELQEGRVLIVPQNFVAARSQS
 f₄₀₄₋₄₂₇ GELQEGRVLIVPQNFVVAARSQSD
 f₄₀₄₋₄₂₆ GELQEGRVLIVPQNFVVAARSQS
 20 f₄₂₇₋₄₃₈ DNFEYVSFKTND
 f₄₂₇₋₄₃₇ DNFEYVSFKTN
 f₄₂₈₋₄₃₈ NFEYVSFKTND
 f₄₂₈₋₄₃₇ NFEYVSFKTN
 f₄₃₈₋₄₉₀ DTPNUGTLAGANSLLNALPEEVIQHTFNLKSQQARQIKNNNPFKFLV PPQESQ
 f₄₃₉₋₄₉₀ TPMIGTLAGANSLLNALPEEVIQHTFNLKSQQARQIKNNNPFKFLVP PQESQ

25 Glicinina G5

[0024] Número de acceso: P04347

30 f₄₄₋₁₃₃ DHRVESEGGLIETWNSQHPELQCAGVTVSKRTLNRNGSHLPSYLPY
 PQMIIVVQKGGAIGFAFPGCPETFEKPQQQSSRRGSRSSQQQLQD
 f₄₄₋₁₃₂ DHRVESEGGLIETWNSQHPELQCAGVTVSKRTLNRNGSHLPSYLPY
 PQMIIWQKGGAIGFAFPGCPETFEKPQQQSSRRGSRSSQQQLQ
 f₄₅₋₁₃₃ HRVESEGGLIETWNSQHPELQCAGVTVSKRTLNRNGSHLPSYLPYP
 35 QMIIVVQKGGAIGFAFPGCPETFEKPQQQSSRRGSRSSQQQLQD
 f₄₅₋₁₃₂ HRVESEGGLIETWNSQHPELQCAGVTVSKRTLNRNGSHLPSYLPYP
 QMIIWQKGGAIGFAFPGCPETFEKPQQQSSRRGSRSSQQQLQ
 f₁₃₃₋₁₄₅ DSHQKIRHFNEGD
 f₁₃₃₋₁₄₄ DSHQKIRHFNEG
 40 f₁₃₄₋₁₄₅ SHQKIRHFNEGD
 f₁₃₄₋₁₄₄ SHQKIRHFNEG
 f₁₄₅₋₁₆₂ DVLVIPLGVPYWTYNTGD
 f₁₄₅₋₁₆₁ DVLVIPLGVPYWTYNTG
 f₁₄₆₋₁₆₂ VLVIPLGVPYWTYNTGD
 45 f₁₄₆₋₁₆₁ VLVIPLGVPYWTYNTG
 f₁₆₂₋₁₇₂ DEPWAISPLD
 f₁₆₂₋₁₇₁ DEPVVAISPL
 f₁₆₃₋₁₇₂ EPWAISPLD
 f₁₆₃₋₁₇₁ EPWAISPL
 50 f₁₈₁₋₁₉₄ DQNPRVFYLAGNPD
 f₁₈₁₋₁₉₃ DQNPRVFYLAGNP
 f₁₈₂₋₁₉₄ QNPRVFYLAGNPD
 f₁₈₂₋₁₉₃ QNPRVFYLAGNP
 f₂₅₆₋₂₈₀ DERKQIVTEGGGLSVISPKWQEED
 55 f₂₅₆₋₂₇₉ DERKQIVTEGGGLSVISPKWQEQE
 f₂₅₇₋₂₈₀ ERKQIVTEGGGLSVISPKWQEED
 f₂₆₉₋₂₉₉ ERKQIVTEGGGLSVISPKWQEQE
 f₃₄₅₋₃₆₆ GVEENICTMKLHENIARPSRAD
 f₃₄₅₋₃₆₆ GVEENICTMKLHENIARPSRA
 60 f₃₆₆₋₄₀₇ DFYNPKAGRISTLNSLTLPALRQFGLSAQYVVLYRNGIYSPD
 f₃₆₆₋₄₀₆ DFYNPKAGRISTLNSLTLPALRQFGLSAQYVVLYRNGIYSP
 f₃₆₇₋₄₀₇ FYNPKAGRISTLNSLTLPALRQFGLSAQYVVLYRNGIYSPD
 f₃₆₇₋₄₀₆ FYNPKAGRISTLNSLTLPALRQFGLSAQYVVLYRNGIYSP
 f₄₀₇₋₄₃₆ DWNLNANSVTMTRGKGRVRVVNCQGNVFD
 65 f₄₀₇₋₄₃₅ DWNLNANSVTMTRGKGRVRVVNCQGNVAF
 f₄₀₈₋₄₃₆ WNLNANSVTMTRGKGRVRVVNCQGNVFD

ES 2 385 621 T3

f₄₀₈₋₄₃₅ WNLNANSVTMTRGKGRVRRVNCQGNVAF
f 436-480 DGELRRGQLLVVPQNPVAEQQGGEQGLEVVFKTNAVSSYIKD
f 436-479 DGELRRGQLLVVPQNPVAEQQGGEQGLEVVFKTNAVSSYIK
f 437-480 GELRRGQLLVVPQNPVAEQQGGEQGLEWFKTNAVSSYIKD
5 f 437-479 GELRRGQLLVVPQNPVAEQQGGEQGLEVVFKTNAVSSYIK
f₄₈₀₋₅₁₆ DVFRVIPSEVLSNSYNLQGSQVRQLKYQGNSGPLVNP
f₄₈₁₋₅₁₆ VFRVIPSEVLSNSYNLQGSQVRQLKYQGNSGPLVNP

Patatina

10 [0025] Número de acceso: CAA25592

15 f₂₃₋₃₅ DTLGEMVTVLSID
f₂₃₋₃₄ DTLGEMVTVLSI
f₂₄₋₃₅ TLGEMVTVLSID
f₂₄₋₃₄ TLGEMVTVLSI
f₇₁₋₁₀₁ DVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF₄₈₀₋₅₁₆AAKD
f₇₁₋₁₀₀ DYIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF₄₈₀₋₅₁₆AAK
20 f₇₂₋₁₀₁ VIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF₄₈₀₋₅₁₆AAKD
f₇₂₋₁₀₀ VIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF₄₈₀₋₅₁₆AAK
f₁₄₀₋₁₅₆ DTRVHQALTEVAISSFD
f₁₄₀₋₁₅₅ DTRVHQALTEVAISSF
f₁₄₁₋₁₅₆ TRVHQALTEVAISSFD
f₁₄₁₋₁₅₅ TRVHQALTEVAISSF
25 f₁₅₆₋₁₈₂ DIKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMYD
f₁₅₆₋₁₈₁ DIKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMY
f₁₅₇₋₁₈₂ IKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMYD
f₁₅₇₋₁₈₁ IKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMY
30 f₁₈₂₋₂₀₇ DICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSNGD
f₁₈₂₋₂₀₆ DICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSN
f₁₈₃₋₂₀₇ ICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSNGD
f₁₈₃₋₂₀₆ ICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSN
f₂₀₇₋₂₁₅ DKYEFNLVD
f₂₀₇₋₂₁₄ DKYEFNLV
35 f₂₃₋₃₅ DTLGEMVTVLSID
f₂₃₋₃₄ DTLGEMVTVLSI
f₂₄₋₃₅ TLGEMVTVLSID
f₂₄₋₃₄ TLGEMVTVLSI
40 f₇₁₋₁₀₁ DVIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF₄₈₀₋₅₁₆AAKD
f₇₁₋₁₀₀ DVIGGTSTGGLLTAMITTPNENITRPF₄₈₀₋₅₁₆AAK
f₇₂₋₁₀₁ VIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF₄₈₀₋₅₁₆AAKD
f₇₂₋₁₀₀ VIGGTSTGGLLTAMITTPNENNRPF₄₈₀₋₅₁₆AAK
45 f₁₄₀₋₁₅₆ DTRVHQALTEVAISSFD
f₁₄₀₋₁₅₅ DTRVHQALTEVAISSF
f₁₄₁₋₁₅₆ TRVHQALTEVAISSFD
f₁₄₁₋₁₅₅ TRVHQALTEVAISSF00
f₁₅₆₋₁₈₂ DIKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMYD
f₁₅₆₋₁₈₁ DIKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMY
50 f₁₅₇₋₁₈₂ IKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMYD

55 f₁₅₇₋₁₈₁ IKTNKPVIFTKSNLAKSPELDAKMY
f₁₈₂₋₂₀₇ DICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSNGD
f₁₈₂₋₂₀₆ DICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSN
f₁₈₃₋₂₀₇ ICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSNGD
f₁₈₃₋₂₀₆ ICYSTAAAPTYFPPHYFVTTSN
f₂₀₇₋₂₁₅ DKYEFNLVD
f₂₀₇₋₂₁₄ DKYEFNLV
60 f₂₀₈₋₂₁₅ KYEFNLVD
f₂₀₈₋₂₁₄ KYEFNLV
f₂₃₉₋₂₆₇ DPKFASIKSLNYKQMLLLSLGTGTNSEFD
f₂₃₉₋₂₆₆ DPKFASIKSLNYKQMLLLSLGTGTNSEF
f₂₄₀₋₂₆₇ PKFASIKSLNYKQMLLLSLGTGTNSEFD
65 f₂₄₀₋₂₆₆ PKFASIKSLNIKQMLLLSLGTGTNSEF
f₃₀₀₋₃₃₃ DYLLSTVFQARHSQNNYLVRQENALTGTTTEMDD

| | |
|----------------------|---------------------------------------|
| f ₃₀₀₋₃₃₂ | DYYLSTVFQARHSQNNYL RVQENALTGTTTTEM D |
| f ₃₀₀₋₃₃₁ | DYYLSTVFQARHSQNNYL RVQENALTGTTTTEM |
| f ₃₀₁₋₃₃₃ | YYLSTVFQARHSQNNYL RVQENALTGTTTTEM D D |
| f ₃₀₁₋₃₃₂ | YYLSTVFQARHSQNNYL RVQENALTGTTTTEM D |
| f ₃₀₁₋₃₃₁ | YYLSTVFQARHSQNNYL RVQENALTGTTTTEM |

5

[0026] Basado en la nueva apreciación de la incidencia de péptidos como las unidades estructurales de las fibrillas proteicas de β -lactoglobulina, la presente invención proporciona un método alternativo ventajoso para la hidrólisis acídica, es decir, hidrólisis enzimática de la preparación de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina (o, análogamente, de preparaciones de glicinina o de patatina). De esta forma, las ventajas de la hidrólisis enzimática, tal como la producción de la composición prefibrilar con pH neutral (es decir, sin necesidad de acidificación y neutralización); evitación de formación de fibrilla con pH neutral; menos reacción secundaria indeseada que ocurre con pH bajo) o hidrólisis relativamente rápida (es decir, sin necesidad de tratamiento térmico durante varias horas, y reacción indeseada asociada con este tratamiento térmico largo) han llegado a estar disponibles para el proceso de fabricación de fibrillas proteicas de β -lactoglobulina. La hidrólisis enzimática proporciona una libertad relativamente grande para elegir, seleccionando las enzimas y condiciones, de dónde lograr la escisión de proteínas. Esto se hace preferiblemente de tal forma que se obtenga un resultado comparable con el de la hidrólisis acídica, por ejemplo, mediante la enzima endoproteinasa AspN que escinde los enlaces peptídicos N-terminales en residuos de ácido aspártico y otras enzimas que ejercen una acción comparable tal como gramzima B (ex Abnova Corp), proteasa V8 (proteasa de la cepa V8 *staphylococcus aureus*; ex Takara Bio Inc.) y glutamil endopeptidasa.

10

15

20

[0027] La composición prefibrilar como formada por hidrólisis enzimática se puede ajustar para formar fibrillas mediante acidificación. Esto se hace preferiblemente en una extensión comparable con el pH que resulta de la hidrólisis acídica mencionada anteriormente, es decir, la composición prefibrilar de β -lactoglobulina hidrolizada enzimáticamente se somete preferiblemente a contacto con un líquido a pH 0.5 a 4, y más preferiblemente un pH de 0.5 a 3, y de la forma más preferible de 1 a 2, dando de esta forma como resultado una carga apropiada de la composición peptídica. La velocidad de formación fibrilar se puede aumentar sometiendo la mezcla a tratamiento de cizalladura o ultrasónico. Una de las ventajas de esta vía es una duración más corta del tratamiento térmico con pH bajo.

25

30

35

[0028] Las fibrillas formadas según la presente invención tienen preferiblemente una proporción mayor que 5, es decir, definiendo la dimensión la más larga de la fibrilla como su longitud, esta longitud es al menos 5 veces más grande que el diámetro o anchura de la fibrilla. Preferiblemente la longitud es de 10 nm a 1 mm, y el diámetro es de 2 a 10 nm. Más preferiblemente la proporción es mayor que 50. La invención proporciona la posibilidad ventajosa de confeccionar la proporción dirigiendo la composición peptídica hacia la presencia de péptidos que facilitan la formación de fibrillas (que generalmente conducirán a una proporción mayor) o la presencia de péptidos que inhiben la formación de fibrillas, tal como los mencionados β -bloqueantes de lámina, que generalmente conducirán a una proporción menor.

40

45

50

55

[0029] La composición prefibrilar hecha mediante el proceso de la invención es adecuada para una variedad de usos. Esto incluye usos de la composición prefibrilar misma como un aditivo en productos alimentarios y no alimentarios, por ejemplo, como un agente estructurante, y particularmente como un agente texturizador, es decir, para viscosidad o gelificación. También incluye el uso de la composición prefibrilar para hacer fibrillas que luego se pueden usar entre otros de la misma forma como se describe en el documento WO 2004/049819. Además, la invención ofrece la posibilidad de acabar con fibrillas como se describen anteriormente, pero entonces formadas *in situ* y/o en un momento elegido. De esta forma, la composición prefibrilar peptídica puede ser usada entre otros para estabilizar una emulsión o una espuma. Con la adsorción en la interfaz apropiada (es decir, agua/aceite en una emulsión o agua/aire en una espuma), la composición prefibrilar peptídica es capaz de agregación fibrilar en estas interfaces, lo que da como resultado un estrato limítrofe robusto, y por lo tanto una emulsión o espuma altamente estable (como resultado de una desproporción disminuida de la espuma). Otro uso en el que la composición prefibrilar peptídica hecha según el proceso de la invención se usa por su capacidad de formar fibrillas, es añadiendo la composición como un ingrediente a un líquido acídico (p. ej., zumo de frutas o bebida de yogur), para dar como resultado la agregación fibrilar (de extensión variable, dependiendo de condiciones como serán aparentes para la persona experta). Esto resultará en una mejora de la viscosidad o gelificación (dependiendo el efecto de la concentración). La velocidad a la que ocurre esto se puede dirigir con referencia a parámetros variables tales como pH y concentración, para obtener agregación fibrilar inmediata o retardada. Particularmente si se desea un efecto retardado, será ventajoso añadir la composición prefibrilar peptídica de una forma encapsulada. Esto puede tener la ventaja de retardar adicionalmente el efecto de agregación fibrilar.

60

[0030] La formación retardada de fibrilla proporciona una ventaja particular en la producción, ya que el producto puede ser mantenido como masa de baja viscosidad durante los pasos del tratamiento, tal como bombeo, en el que una baja viscosidad puede ser provechosa.

65

[0031] La composición peptídica prefibrilar tiene una gran ventaja ya que ella misma no tiene una influencia sustancial en la textura de alimentos y bebidas. Esto permite hacer un producto alimenticio sólido o líquido que tiene un efecto integrado de satisfacción del estómago (saciedad). De esta forma, cuando es consumido por una persona, la composición peptídica no molesta en la sensación de la boca, ya que permanecerá intacta hasta llegar al jugo gástrico. Debido al pH del mismo, y al beneficio de la temperatura (corporal) elevada, la agregación fibrilar ocurrirá casi

instantáneamente. Debido a la gelificación que ocurre allí *in situ*, la persona que consuma el producto alimenticio con la composición prefibrilar de la invención experimentará saciedad, es decir, la impresión de una comida relativamente más grande que la consumida realmente. Esto también puede tener beneficios en alimentos dietéticos de animales, por ejemplo, para animales de compañía. En vista al sabor del péptido, se preferirá emplear la composición prefibrilar en forma enmascaradora del sabor o encapsulada, particularmente si hay presentes sustancialmente péptidos hidrofóbicos relativamente pequeños. En otra forma de realización preferida, en la que se eligen las composiciones prefibrilares enriquecidas respecto a los péptidos mencionados anteriormente relativamente grandes; es una ventaja una necesidad disminuida de medidas de enmascarado del sabor.

5 [0032] El experto en la materia conocerá técnicas para enmascarar el sabor y/o para el encapsulado de péptidos, y no requieren ser aclaradas aquí.

[0033] La invención también se refiere a la fabricación de fibrillas de un material proteico basadas en una preparación de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina obtenible mediante un proceso como se ha descrito sustancialmente anteriormente. Es decir, el proceso de dos pasos, comprendiendo primero someter la proteína a hidrólisis para formar péptidos, y luego permitir la formación de fibrillas en pH ácido. Los productos resultantes por la confección de la composición peptídica se distinguen de un proceso en el que la preparación de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina está sujeta a un proceso convenido de hidrólisis y agregación fibrilar.

15 [0034] La invención encierra el uso de las composiciones prefibrilares mencionadas anteriormente, al igual que las fibrillas obtenibles conforme a la invención en productos alimentarios, particularmente en productos lácteos ácidos tales como yogur o queso. Este uso sirve a los propósitos mencionados anteriormente, tales como la provisión de propiedades de estructuración. La invención también encierra los productos alimentarios resultantes.

[0035] En la invención se pueden hacer combinaciones de las diferentes fibrillas. Además, se pueden hacer combinaciones con péptidos obtenibles a partir de lisozima, que también son formadores de fibrillas.

[0036] La invención será ilustrada adicionalmente de ahora en adelante con referencia a los siguientes ejemplos no limitativos, que incluyen una descripción de las figuras.

30 **Ejemplo 1 (ejemplo de referencia no según la invención)**

[0037] El pH de una solución de proteína de 3% de β -lactoglobulina bovina se estableció en 2 añadiendo una solución de HCl concentrada y se calentó durante 20 horas a 85°C en un dispositivo de cizallamiento a una velocidad de cizallamiento constante de 323 s⁻¹. Durante este tratamiento térmico se formaron agregados fibrilares. La muestra calentada fue diluida a una concentración de proteína de 0.8 g/l. Las fibrillas y el material proteico no agregado de la muestra se separaron usando filtros centrifugadores (MWCO 100,000). El retenido contenía agregados fibrilares, como mostraron las mediciones por fluorescencia con tioflavina T, cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución en condición no disociada, y microscopía electrónica de transmisión. El filtrado no contenía fibrillas.

40 [0038] El retenido fue lavado y centrifugado dos veces con una solución HCl con pH 2 para eliminar material proteico no agregado que queda en el retenido. La proporción de material proteico presente en las fibrillas en la solución de β -lactoglobulina calentada fue de aproximadamente 28 % en peso.

45 [0039] El análisis del retenido con cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución en condiciones de disociación de fibrillas mostró que en el total de la muestra calentada, retenido y filtrado, no fue visible ningún valor máximo en la posición de β -lactoglobulina no calentada, y todos los materiales eluidos más tarde que la β -lactoglobulina no calentada, indicando que las fibrillas no están compuestas por moléculas intactas de β -lactoglobulina, pero por péptidos derivados de la hidrólisis ácida que ocurre durante el calentamiento con pH 2.

50 [0040] Las masas moleculares de los péptidos presentes en la muestra calentada, retenido y filtrado se caracterizaron usando espectrometría de masas MALDI-TOF. Los péptidos tenían masas moleculares entre 2,000 y 8,000 Da, lo que significa que las fibrillas están compuestas por fragmentos peptídicos. La mayoría de los fragmentos peptídicos (ambos, agregados y no agregados) fueron un resultado de la escisión de los enlaces peptídicos antes o después del ácido aspártico. Habían presentes cuatro fragmentos peptídicos en el retenido y el total de la muestra calentada y no presentes en el filtrado, es decir [f1-32], [f1-33], [f1-52] y [f1- 53]. El fragmento peptídico presente de forma dominante en las fibrillas fue [f12-33], es decir, IQKVAGTWYSLAMAASDISLL. Este péptido también estaba presente en el filtrado.

60 **Ejemplo 2**

[0041] Una solución de 2 % en peso de β -lactoglobulina en 50 mM de Tris-HCl y 2 mM de acetato de zinc, pH 8, fue incubada a 37 °C con endoproteinasa AspN (P8104S, New England Biolabs), que escinde enlaces peptídicos N-terminales en residuos de ácido aspártico. Después de la hidrólisis había presente ~20% de β -lactoglobulina intacta, mientras el resto de la proteína fue hidrolizada en péptidos de diferentes tamaños. La solución de proteína hidrolizada fue acidificada entonces a pH 2. Como resultado, la viscosidad aumentó. La figura 1 muestra una imagen de

microscopía electrónica de transmisión de la solución de β -lactoglobulina después de la hidrólisis enzimática e incubación con pH 2. En esta figura se pueden observar agregados fibrilares con una longitud de $\sim 1 \mu\text{m}$, lo que muestra que la hidrólisis enzimática es una vía alternativa para obtener agregados fibrilares de β -lactoglobulina.

5 **Ejemplo 3 (ejemplo de referencia no según la invención)**

10 [0042] Las fibrillas de proteínas como β -lactoglobulina y glicinina de soja se pueden preparar calentando la proteína con pH 2. Los péptidos presentes después del calentamiento con pH 2 fueron un resultado de la hidrólisis de los enlaces entre un residuo de ácido aspártico y cualquier otro residuo de aminoácido. Las fibrillas de glicinina de soja también están compuestas predominantemente por péptidos. Un aislado de glicinina de soja se preparó a partir de precipitación isoelectrónica de harina de soja con pH 6.4. Las fibrillas de glicinina de soja se prepararon calentando (85 °C, 20 h) y cizallando (velocidad de cizallamiento de 323 s⁻¹) una solución de glicinina de soja de 2 % en peso con pH 2. Después de este tratamiento, las fibrillas y proteínas no agregadas se separaron las unas de las otras usando tubos de filtro centrífugos (corte de peso molecular de 100 kDa). La fracción no separada, la fracción fibrilar, la fracción no agregada y la glicinina de soja no calentada se analizaron usando HP-SEC (cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución). Se usaron condiciones de disociación de fibrilla, lo que significa que las muestras fueron disueltas en un tampón con 8 M de cloruro de guanidina y 0.1M de 1,4-ditiotreitol (pH 8). Los perfiles de elución de HP-SEC de las diferentes muestras se muestra en la figura 2.

20 [0043] La figura 2 representa perfiles de elución HP-SEC (condiciones de disociación de fibrillas) de (a) glicinina de soja no calentada, (b) muestra calentada totalmente, (c) fracción fibrilar, y (d) material proteico no agregado. Las fibrillas fueron disociadas usando 8 M de cloruro de guanidina y 0.1 M de DTT (pH 8). El aumento en la señal UV del perfil de elución después de 11.5 ml (indicado por la línea punteada) se debe a la elución del cloruro de guanidina.

25 [0044] El material calentado se eluyó más tarde que la solución de glicinina de soja no calentada, lo que muestra que la hidrólisis tuvo lugar durante el tratamiento térmico con pH 2. Por lo tanto, los péptidos estaban presentes después del tratamiento térmico. Gran parte del material presente en la fracción de fibrilla también se eluyó más tarde que la glicina de soja no calentada. Esto muestra que las fibrillas de glicinina de soja están compuestas predominantemente por péptidos.

30 **Ejemplo 4 (ejemplo de referencia no según la invención)**

35 [0045] Las fibrillas se obtuvieron a partir de patatina calentando y agitando un 2 % en peso de solución de proteína durante 24 h a 70 °C y pH 2. La figura 3 muestra una imagen TEM de las fibrillas obtenidas a partir de patatina. Estas fibrillas eran más cortas ($\sim 500 \text{ nm}$) y más flexibles que las fibrillas formadas a partir de proteína de soja o β -lactoglobulina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la producción de una composición prefibrilar peptídica por la hidrólisis de una proteína seleccionada del grupo consistente en preparación de proteína de lactosuero con β -lactoglobulina, preparación de proteína de soja con glicinina, patatina, y mezclas de las mismas, comprendiendo el método el sometimiento de la proteína a hidrólisis enzimática, con la condición de que la composición prefibrilar peptídica no sea un hidrolizado comprendiendo una proteína de leche que incluya beta lactoglobulina hidrolizada con al menos una enzima proteolítica que se escinde preferentemente en un residuo de ácido glutámico o de ácido aspártico, y donde el hidrolizado está enriquecido en uno o más de los péptidos AQSAPLRVYVE, ILLQKWE, KTKIPAVFKID, o KTKIPAVFKIDALNE.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que las enzimas son seleccionadas para obtener una escisión mayoritaria antes o después del ácido aspártico.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína es β -lactoglobulina.
4. Método según la reivindicación 3, en el que el péptido dominante en la composición prefibrilar peptídica es el péptido TQKVAGTWYSLAMAASDISLL.
- 20 5. Método para la producción de una composición fibrilar proteica, comprendiendo la producción de una composición prefibrilar peptídica con un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y en un paso siguiente el sometimiento de la composición prefibrilar a un pH ácido a temperatura elevada con una duración suficiente para permitir el comienzo de la agregación fibrilar.
- 25 6. Uso de una composición prefibrilar peptídica obtenida en un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 como un aditivo en un producto alimentario o no alimentario.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que el producto alimentario es un alimento dietético o bebida dietética humana o animal para el control del peso, y donde la composición prefibrilar es capaz de agregación fibrilar en el jugo gástrico.
- 30 8. Uso según la reivindicación 6, en el que el producto alimentario es un alimento o bebida humana o animal, y donde se impide que la composición prefibrilar complete la agregación fibrilar en el jugo gástrico, preferiblemente comprendiendo una o más sustancias que contrarrestan el enlace de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas de los péptidos.
- 35 9. Uso según la reivindicación 6, en el que el producto alimentario es un alimento o bebida ácida tal como un yogur o queso, y donde se permite a la composición prefibrilar formar fibrillas después de la producción.
10. Producto alimentario, tal como yogur o queso, comprendiendo una composición prefibrilar peptídica obtenible por un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

Figura 1

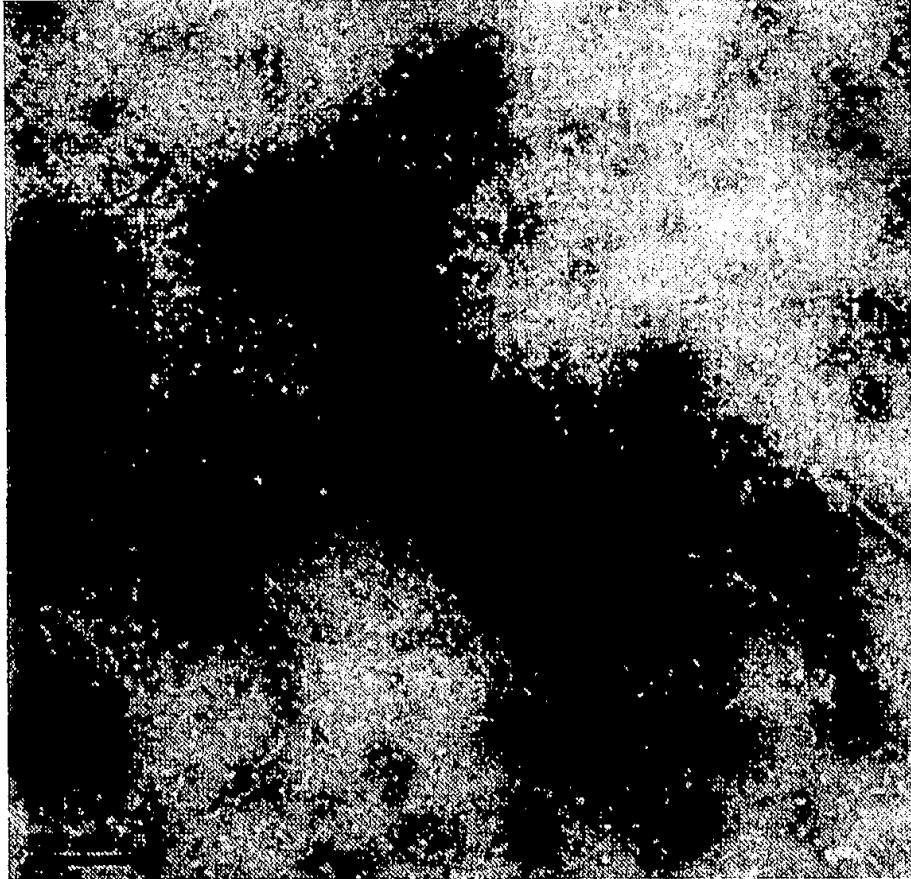


Figura 2

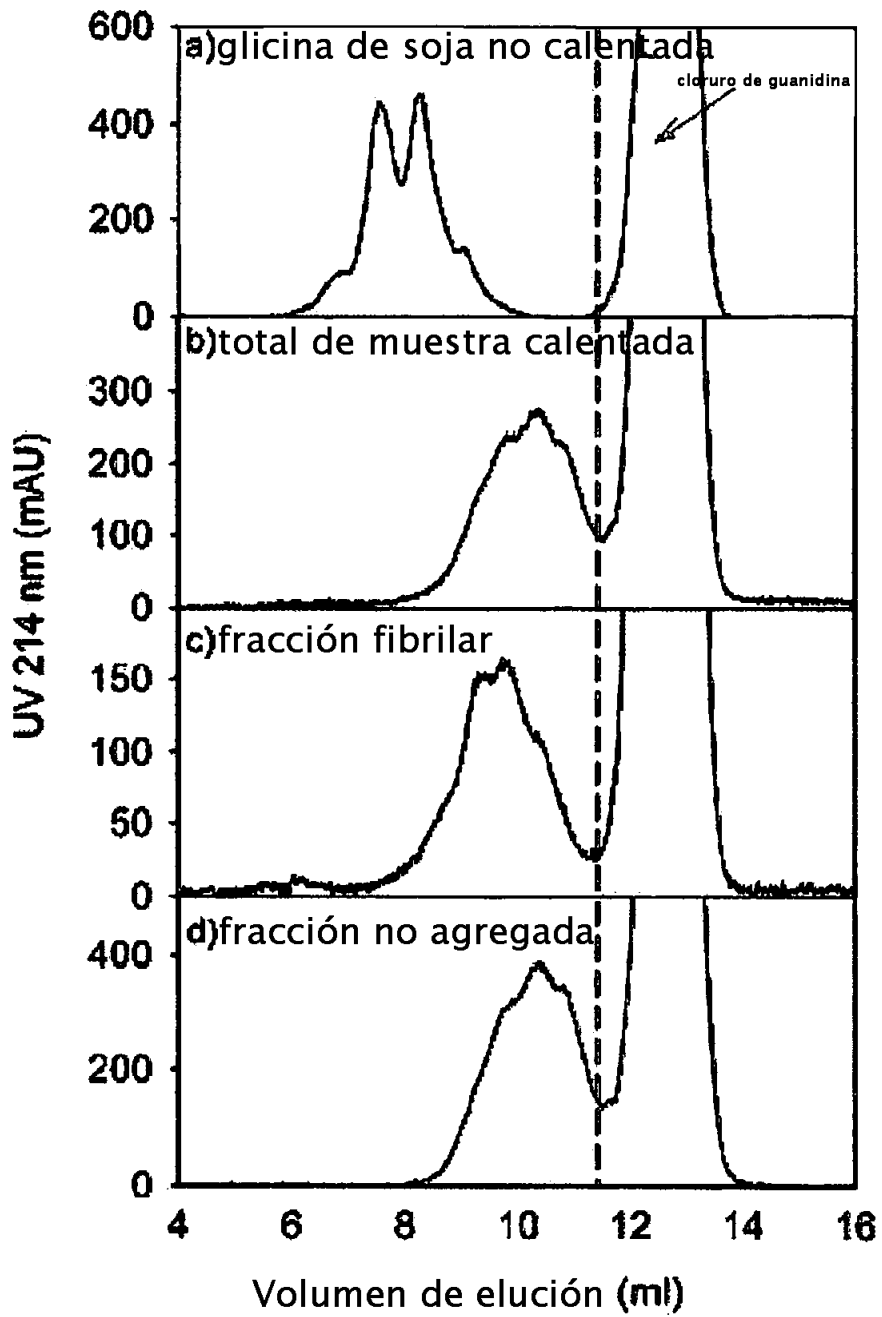


Figura 3

