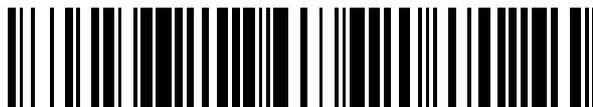


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 412**

21 Número de solicitud: 201031612

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)

A23L 1/015 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

03.11.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.12.2012

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:

10.12.2012

71 Solicitantes:

**BIOMEDAL, S.L. (100.0%)
AVDA. AMERICO VESPUCIO 5E, 1ª P M12
41092 SEVILLA, ES**

72 Inventor/es:

**CEBOLLA RAMÍREZ, Ángel ;
SIGLEZ GRANADO, Miguel;
PEDRAJAS JURADO, Josefa Valentina y
TABRAUE CHAVEZ, Mavys**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **Solución para extracción de gluten y métodos de uso.**

57 Resumen:

La invención describe una solución de extracción y solubilización de gluten en alimentos, métodos de uso y su aplicación en métodos de análisis del gluten. El objeto de la invención consta de una solución acuosa que contiene arginina y un procedimiento de uso en el cual se pone en contacto directo con la muestra y se le añade posteriormente una solución con etanol para completar la solubilización de las proteínas del gluten relevantes para el análisis. Usando esta solución de la invención es posible realizar un procedimiento más efectivo de extracción de gluten en alimentos tratados o no por calor y/o hidrólisis, pudiendo utilizarse en análisis cuantitativo por medio de técnicas inmunológicas, como son distintos ensayos ELISAs, tiras inmunocromatográficas, biosensores, etc.

ES 2 392 412 A1

DESCRIPCIÓN

Solución para extracción de gluten y métodos de uso.

SECTOR DE APLICACIÓN DE LA INVENCION

5

La invención está dirigida fundamentalmente al ámbito de la analítica química de proteínas o péptidos que forman parte de alimentos. El sector preferente de aplicación será la Industria alimentaria y los laboratorios analíticos, y en general, todos los laboratorios que realicen análisis de detección de gluten o péptidos del gluten en
10 alimentos básicos, elaborados, procesados fisicoquímicamente e incluso biológicamente. Preferentemente, podrá ser aplicado en aquellos laboratorios que realicen extracción de gluten para ensayos de cuantificación basados en anticuerpos monoclonales como ELISAs, Western blots, detección de tiras inmunocromatográficas y biosensores.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La celiaquía es una intolerancia permanente al gluten, en individuos genéticamente predispuestos, que se manifiesta por una lesión grave de la mucosa del intestino delgado tras la ingestión de esta proteína que se encuentra presente en
20 determinados cereales como trigo, cebada, centeno y en menor medida, avena. (Col, S G and Kagnuff, M F. Celiac Disease. Annual review of nutrition 1985, 5:241-266; Cooper, B T; Holes, G K T and Cooke, W T. Celiac disease and immunological disorders. British Medical Journal 1978,1:537-539.) El gluten está compuesto por un conjunto de proteínas diferenciadas entre prolaminas (gliadina en trigo, hordeína en cebada, secalina
25 en Centeno y aveninas en avena), dañinas para el enfermo celíaco, y gluteninas, actualmente en estudio sobre su potencial toxicidad en enfermos celíacos. (Shewry, P R: Halford, N G; Belton, P S and Tatham, A S. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. The Royal Society. 2002).

La enfermedad celíaca se desencadena por la presencia de péptidos procedentes
30 de la fragmentación de las prolaminas, las cuales no son digeridas por las proteasas gastrointestinales y resultan ser tóxicas para los pacientes celíacos. La estructura peptídica es esencial para producir el efecto tóxico, ya que cuando los polipéptidos de las prolaminas se hidrolizan hasta los aminoácidos constituyentes, se pierde la capacidad lesiva para el intestino. Entre los “péptidos tóxicos” identificados el
35 denominado 33-mer, (ver lista de secuencias) que contiene 6 epítopos de

reconocimiento de las células T, es uno de los péptidos más inmunogénicos presente en la gliadina y uno de los responsables de la reacción inmune que se desencadena en el intestino de los pacientes celíacos (Shan, L. y cols., Basis for gluten intolerance in celiac sprue. 2002, Science, 297:2275-2279; Sollid, L.M., Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder 2002, Nat Rev Immunol., 2:647-655). Estos autores
5 demostraron mediante estudios in vitro e in vivo en ratas y en humanos, que el péptido 33-mer de la α -gliadina es muy resistente a la proteólisis enzimática gástrica, pancreática e intestinal. Estos péptidos pasan por la mucosa intestinal donde interaccionan con la transglutaminasa tisular, que transforma los residuos de glutamina
10 en ácido glutámico y, como consecuencia de ello, se producen una serie de cambios que desencadenan reacciones con base inmunológica, que acaban destruyendo las vellosidades intestinales.

El único tratamiento existente a día de hoy consiste en una dieta estricta sin gluten (Fassano A. Surprises from Celiac Disease. Scientific American, August 2009)
15 durante toda la vida del paciente, de ahí la importancia de que existan técnicas de cuantificación de gluten presente en alimentos. Existen diversos métodos de gran sensibilidad para detectar gluten de forma indirecta como es la detección de gluten por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), que detecta el ADN de los cereales que contienen gluten. Esta técnica es muy sensible pero posee el inconveniente de que no
20 reconoce directamente a la proteína del cereal. Se asume que la proteína y el ADN del gluten están presentes siempre en relación proporcional, lo cual es difícil de sostener después de la variedad de tratamientos que sufren los alimentos. Los fragmentos del gluten también pueden detectarse de forma más directa por espectroscopia de masas MALDI TOFF, técnica instrumental que puede ser muy precisa y cuantitativa a la hora
25 de determinar los péptidos (fragmentos de proteínas) del gluten, pero precisa un instrumental muy costoso y necesita personal altamente especializado.

Los métodos mediante técnicas de inmunoensayos a través de anticuerpos que reconocen secuencias de aminoácidos del gluten siguen siendo los más convenientes al unir sencillez, sensibilidad, economía, además de detectar directamente la proteína
30 inmunotóxica. Los primeros métodos para la detección y cuantificación de gluten existentes estaban basados en técnicas inmunoabsorbentes, pero todas ellas basadas en anticuerpos policlonales (Ayob, M K; Rittenburg, J; Allen, J C and Smith, C S. Development of a rapid enzyme linked immunosorbent assay for gliadin determination

in food. *Food Hydrocolloids*, 1988, 2:39-49). Actualmente se ha optimizado esta metodología utilizando anticuerpos monoclonales frente a epítomos específicos, evitando los problemas que surgen a la hora de utilizar anticuerpos policlonales que no pueden garantizar la reproducibilidad de lotes y tienen más falsos positivos (Sorell, E; 5 López, J A; Valdés, J; Alfonso, P; Camafaeita, J; Acevedo, B; Chirido, F; Gavilondo, J and Méndez, M. An innovative Sandwich ELISA system based on an antibody Cocktail for gluten analysis. *FEBS Letters* 1988, 136:46-50).

La extracción del gluten de la matriz es un paso fundamental para la cuantificación de esta proteína mediante las técnicas antes mencionadas. Los protocolos 10 establecidos en la actualidad para la extracción de gluten comprenden el uso de soluciones de etanol-agua, normalmente en una proporción del 60-70% de etanol (Osborne T.B., *The vegetable proteins*, 2nd ed. London: Longmans, Green and co,1924). Sin embargo, la extracción no se puede llevar a cabo con estas soluciones cuando se trata de alimentos tratados con calor. Muchos de los alimentos para celíacos 15 son sometidos en su proceso de elaboración a altas temperaturas (150-220°C), lo que resulta en un aumento de las interacciones proteicas y con ello se producen cambios estructurales en las gliadinas, provocando la desnaturalización de las fracciones tóxicas del gluten y haciéndolas insolubles. Una vez desnaturalizadas no pueden ser extraídas con las soluciones hidroalcohólicas convencionales.

20 Las técnicas inmunológicas existentes recogen el uso de anticuerpos como el R5 y el G12, en tiras inmunocromatográficas, ELISAs tipo Sandwich y ELISAs Competitivos. Éstos últimos surgen ante la necesidad de que la técnica reconozca prolaminas hidrolizadas, que pueden tener menos de dos epítomos, siendo ésta la cantidad mínima de epítomos a detectar con los ELISAs tipo Sandwich. Las soluciones 25 de extracción de gluten deben ser entonces compatibles con el uso de ambas técnicas.

García y cols. (Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2005, 17:529-539; US 7,585,529 B2) logran una mejora en la extracción especialmente en 30 alimentos tratados con calor, utilizando para ello el efecto combinado de la solución etanol-agua con agentes reductores y caotrópicos como el cloruro de guanidinio en una solución tamponada con fosfato a pH 7-8. Sin embargo, esta alternativa conocida por algunos expertos en la materia como Cocktail de Méndez, presenta inconvenientes importantes como su incompatibilidad en los ELISAs Competitivos, en los que el

anticuerpo se incubaba con la muestra extraída produciendo la inactivación de dicho anticuerpo, además de proporcionar un olor desagradable y tener componentes peligrosos para su manipulación. El efecto desnaturalizante de las proteínas del cloruro de guanidinio, lo hace inviable en algunos ensayos inmunológicos en los que el anticuerpo, conjugado o no a un enzima indicador, se pone en contacto con el extracto de muestra. Esto se debe a que las proteínas analíticas pierden sus propiedades.

Aunque en los ensayos inmunológicos se extrae solo la fracción soluble del gluten en etanol-agua (prolaminas), algunas de las proteínas descritas como tóxicas del gluten, como las gluteninas, son susceptibles de formar puentes disulfuro y polimerizar si los alimentos se tratan a temperaturas superiores a 150°C. Aunque no se ha demostrado este efecto de forma incontestable, podría ser necesaria la adición de agentes reductores para que las prolaminas no queden atrapadas en las nuevas reorganizaciones de los puentes disulfuro. Por ello, en la patente US 7,585,529 B2, se ve necesario la adición de estos agentes. Sin embargo, el β -mercaptoetanol descrito en dicha publicación, no es deseable por su toxicidad y olor desagradable. Es preferible el uso de otros agentes reductores para realizar esta supuesta función beneficiosa en los procesos extractivos de gluten.

Muchos de los alimentos potencialmente consumibles por enfermos celíacos ya sean de forma nativa o por el proceso de elaboración de los mismos al tratarse a altas temperaturas (150-220°C) se producen algunos cambios debido a las interacciones entre proteínas, donde se incluyen cambios que pueden involucrar a grupos disulfuros al mezclarse con aire, oxígeno y nitrógeno. Estas interacciones varían en función del contenido en sulfhidrilos y sulfuros que presente el alimento (Tsen, C and Bushuk, W. Changes in sulphhydryl and disulphide contents of doughs during mixing under various conditions. *Cereal Chem* 1963.40, 399.) por lo que una parte de las fracciones tóxicas del gluten puede estar de forma insoluble y desnaturalizada, no pudiendo ser extraída de forma completa con la solución etanol-agua 60%.

Se ha descrito el efecto solubilizante de la arginina para sustancias orgánicas e incluso proteínas poco solubles en agua como el gluten (Arakawa T., Yoshiko K., Koyamac A. H. Solubility enhancement of gluten and organic compounds by arginine (2008) *International Journal of Pharmaceutics* 355:220–223). Su capacidad a ciertas concentraciones puede ser similar a la del cloruro de guanidinio, pero no es tóxica ni

tiene olor. Además su capacidad de desnaturalizar otras proteínas no es conocida, por lo que su presencia puede ser compatible con los ensayos inmunológicos.

SUMARIO DE LA INVENCION

El objeto de la presente invención es una solución de extracción de gluten
5 basada en un agente disociativo de interacción de proteínas inocuo para el ser humano y puede ser compatible con los análisis inmunológicos más habituales, incluyendo el ELISA Competitivo o las tiras inmunocromatográficas.

Esta solución acuosa de extracción de prolaminas del gluten está compuesta por arginina como un agente que actúa sobre las interacciones proteína-proteína y proteína-
10 superficie, en un rango de concentración de 0,1 a 2M, preferentemente a una concentración inferior a 1 M. La solución de la invención tendría un pH comprendido entre 6 y 8,5 bien tamponada espontáneamente al disolverse la arginina en agua, o con ayuda de otros tampones típicamente usados en formulaciones como un tampón fosfato. El procedimiento de uso de la invención se realiza poniendo en contacto dicha solución
15 de arginina con la muestra homogeneizada durante un tiempo, y añadiendo posteriormente una solución etanol-agua al 80% consiguiendo de forma conjunta una mayor extracción de las fracciones tóxicas de gluten presentes en la matriz, pudiendo después determinarse la presencia de gluten con las técnicas analíticas oportunas mediante la dilución previa del extracto hidroalcohólico en una solución acuosa
20 tamponada.

Con esta solución extractiva y el procedimiento de uso también objeto de la invención, se consigue una mayor recuperación de gluten en distintos tipos de matrices procesadas o no procesadas por calor y/o hidrolizadas. Además es objeto de la presente invención aplicar un método inmunológico para medir las prolaminas del
25 gluten extraído con la solución de extracción con arginina. Estos métodos de detección de las prolaminas extraídas pueden ser preferentemente la técnica ELISA tipo Sandwich o Competitivo, Western blot, técnicas de inmunocromatografía lateral (tiras inmunocromatográficas) e incluso biosensores basados en anticuerpos. Por tanto, productos de análisis de gluten que incorporen dicha solución serían objeto de la
30 presente invención

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION.

El objeto de la invención es una solución para la extracción de gluten de alimentos y bebidas, usando un agente que interfiere en la interacción proteína-proteína y proteína-superficie, preferentemente arginina a una concentración entre 2 y 0,1 M. Las soluciones realizadas con arginina no necesitan en la mayoría de los casos de ningún otro aditivo para poder extraer y mantener accesible la gliadina a los reactivos analíticos de ensayos inmunológicos, como el ensayo ELISA, tiras inmunocromatográficas o Western blot. Sin embargo, la invención contempla que la solución con arginina tenga variantes de formulación que puedan adaptarse mejor para algunas matrices especiales. Por ejemplo, pueden contener además de arginina, agentes que favorezcan la extracción en determinadas matrices como por ejemplo un agente reductor para romper puentes de disulfuro entre proteínas, un tampón que permita mantener mejor el pH entre un rango de 6 a 8,5 u otros agentes diseñados para matrices alimentarias especiales como el chocolate, que requerirían aditivos adicionales como gelatina y polivinilpirrolidona. También pueden constituirse a partir de soluciones madre con una base como el PBS (solución con cloruro sódico y fosfato sódico a pH 7). La solución podría también completarse opcionalmente con un agente reductor, para algunos alimentos procesados a muy altas temperaturas, aunque en la inmensa mayoría de alimentos que pueden ser analizados, incluso en aquellos tratados a más de 180°C, no se han visto mejoras de forma clara en el grado de extracción, sobre aquellas que solo contienen arginina.

Así mismo, procedimientos de extracción con la solución que contiene arginina, presentan mejoras con respecto a otros agentes disociadores como hidrocloreuro de guanidinio o urea al ser más compatible con muchas técnicas analíticas inmunológicas. La concentración de arginina en la composición de la invención puede variar entre 0,1 y 2 M, siendo 0,5 M una concentración suficientemente eficaz, a partir de la cual no se observan mejoras en la extracción en muestras fortificadas. La forma preferente del componente clave de la solución de extracción de gluten de la invención es la L-arginina y se puede usar desde una forma salina como clorhidrato. La ventaja de este componente frente al Cocktail de Méndez es su inocuidad y su ausencia de olor, además de que consigue mejores resultados que la solución que usa agentes reductores como β -mercaptoetanol, que presenta un olor indeseable y necesita campanas de extracción para su uso. Esta propiedad de inocuidad además le confiere la posibilidad de usarse en

condiciones menos restrictivas de equipos de laboratorio y de operario que realice el análisis.

En cualquier caso, la solución de la invención podría completarse con un agente reductor como el ditioneitol (DTT), el beta-mercaptoetanol, o el TCEP-HCl (*tris*(2-carboxyethyl) phosphine). Puesto que no perjudica la posibilidad de extraer gluten en los casos en los que se ha combinado con la arginina, pero por si mismo se ha visto que puede permitir mejorar la extracción de gluten, no sería sorprendente que algunas matrices alimenticias tratadas por calor puedan ser mejor extraídas combinando agentes reductores con la arginina. La concentración de estos agentes reductores puede variar en la composición de la invención entre 0,005-0,5 M.

Una característica diferenciadora de esta invención es que puede utilizarse agua bi-distilada o purificada como solvente de la composición de arginina manteniendo un pH neutro, pero la solución puede también tamponarse añadiendo cualquier solución tamponadora con valores de pH entre 6-8,5 como por ejemplo tampón fosfato salino (PBS) con valor de pH entre 6-8,5.

La solución con arginina, puede aplicarse a muestras alimenticias tanto procesadas como no procesadas por calor y/o hidrolizadas, siendo compatible con el posterior análisis mediante técnicas ELISA (figuras 2,3 y 4) e inmunocromatografía de flujo lateral (tabla 1).

Para el método de la invención se usa posteriormente a la solución con arginina, una solución etanol-agua antes de ser analizada por la técnica correspondiente. Por tanto la muestra, bien homogeneizada por procedimientos conocidos por cualquier técnico del sector (mortero, batidora, homogeneizador de laboratorio, etc.) debe ser mezclada inicialmente en una proporción 1:10 con la solución de arginina de 0,1 M a 2 M de la invención, incubándose a una temperatura entre 45°C y 55°C por un período de tiempo que puede bastar entre 2 minutos para algunas muestras sencillas como muestras líquidas, hasta una hora para matrices más complejas, después del cual se añade la solución etanol agua que puede variar entre el 60 y el 80%. De esta forma las prolaminas del alimento con gluten son extraídas y solubilizadas para que luego puedan ser analizadas por métodos inmunológicos, como ELISAs, Western blot, inmunocromatografía, inmunobeads, o biosensores. También se podría usar en extracción de muestras para análisis por espectroscopía de masas.

La presente invención también comprenderá aquellos kits para detectar gluten que incluyan una solución de extracción con arginina, preferentemente L-arginina, y opcionalmente con otros agentes que pueden estar parcialmente mezclados o separados de la solución como son agentes reductores, un tampón fosfato, detergentes suaves como la polivinilpirrolidona y gelatina para muestras con chocolate, etc. El kit también puede incluir elementos para la cuantificación y/o detección de gluten mediante las técnicas ELISA o cromatografía de flujo lateral. El kit puede contener también otros reactivos como por ejemplo la solución etanol-agua o sus componentes por separado, o reactivos requeridos para la realización del ELISA o cromatografía de flujo lateral para la cuantificación y/o detección de gluten, total o parcialmente mezclados juntos o separados.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención, pero en ningún momento deben ser considerados como límite de la aplicación de la misma.

15 EJEMPLOS DE APLICACIÓN DE LA INVENCION

Ejemplo 1. Extracción de gluten realizada con una solución acuosa con arginina.

En el presente ejemplo de aplicación de la invención se muestra cómo la extracción con un tratamiento previo con la solución de la invención utilizando distintas concentraciones de L-arginina es más efectiva en un rango amplio de concentraciones que la extracción con etanol-agua al 60%.

El presente ejemplo de aplicación muestra la posibilidad de usar la arginina a distintas concentraciones para extraer más eficazmente el gluten a partir de muestras alimenticias que han sido tratadas por calor.

Se realiza muestra fortificada para utilizarla en la comparación de las distintas soluciones extractivas. Esta muestra fortificada consiste en la preparación de un pan al que se le añade una cantidad conocida de gliadina (Se añaden 17 mg de Gliadina de referencia Europea PWG para una masa final de 285 g para una muestra de 120 ppm de gluten). Para ello utilizamos una panificadora automática para el hogar (Princess) en la cual y siguiendo los pasos del manual realizamos un pan, utilizando los siguientes productos: un preparado panificable sin gluten (Proceli), levadura química o gasificante (Royal) sin gluten y agua destilada a la que se le añade la cantidad conocida de gliadina, disuelto en etanol-agua 60%, necesaria para obtener los mg/kg de gluten deseados.

Una vez añadidos todos los componentes, se programa la panificadora en su modo BASIC, donde se tiene dos periodos de amasado de 20 minutos, dos fermentaciones aproximadamente de 20 minutos cada uno y un período de horneado a 180°C de 90 minutos.

5 Se toman muestras en tres puntos distintos, una primera toma después de que haya pasado el primer amasado y la primera fermentación donde aún la masa está a temperatura ambiente (25°C). Una segunda toma de muestra después del segundo amasado y de la segunda fermentación donde la panificadora alcanza una temperatura de aproximadamente 50°C, y una última toma de muestra al final del horneado donde la
10 muestra se expone a 180°C durante 90 minutos.

Con esta sistemática de muestreo podremos comprobar el rendimiento de las soluciones de extracción en función de la temperatura a la que haya sido sometida la muestra.

Las muestras o matrices que van a ser analizadas son preparadas de manera
15 convencional incluyendo la molienda y añadiendo la muestra o matriz a un tubo de polipropileno estéril. A este tubo se añade la composición de la invención, cerrando el tubo y sellándolo por ejemplo con parafilm para evitar evaporación. La mezcla se mantiene en agitación, por ejemplo en una de sus aplicaciones, a 50°C durante un período de 40 minutos con agitaciones periódicas. Tras lo cual se atempera la mezcla a
20 temperatura ambiente (18-25°C) y se añade la solución etanol agua, por ejemplo a 80%, incubándose en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el período de agitación, el tubo con la mezcla se somete a centrifugación separando el sobrenadante, donde tenemos la prolamina extraída, en un tubo limpio, pudiendo ser cuantificado el gluten mediante la técnica elegida, ya sea ELISA (Figura 1) o tiras
25 inmunocromatográficas que usan un anticuerpo que reconoce las fracciones tóxicas del gluten como el péptido 33mer de la gliadina (Morón y cols., 2008, Am J Clin Nutr., 87:405-414; 2008, PloS One, 3:e2294). Estos métodos comercializados hasta la fecha de la presente patente con una solución hidroalcohólica como método de extracción, son conocidos como Glutentox ELISA y Glutentox Sticks (Biomedal S.L. España).

30 La solución etanol-agua no pudo extraer por sí sola toda la gliadina cuando se compara con las soluciones con arginina, al estar las fracciones del gluten (α -, β - γ -

gliadinas) desnaturalizadas por el tratamiento por calor del alimento (Figura 1), puesto que formará agregados más insolubles. Con la solución de la invención a partir de 0,01 M de arginina se extrae más prolaminas que con la solución etanol-agua (Figura 1). La disminución de la concentración hasta 0,5M no reduce significativamente el rendimiento de la extracción, lo que si ocurre a partir de esta concentración. La solución de la invención por tanto muestra su rendimiento óptimo a concentraciones de entre 0,5-2 M de arginina.

Ejemplo 2. Detección de Gluten extraído con la solución de la invención en alimentos procesados y no procesados por calor mediante un ensayo ELISA.

En el presente ejemplo se muestran los efectos positivos sobre la capacidad de detección de gluten en distintos tipos de alimentos que han sido procesados con calor usando la solución de la invención para extraer el gluten y un ensayo ELISA Sandwich G12. Este ejemplo muestra la comparación de la eficacia de la extracción de la invención respecto a los métodos utilizados habitualmente de alimentos tratados o no por calor como son la solución etanol-agua y con el Cocktail de Méndez.

Materiales usados: Los siguientes materiales fueron utilizados para la realización de este experimento.

a) Alimentos tratados con calor a altas temperaturas ($\geq 200^{\circ}\text{C}$).

- a.1) Alimentos con contenido en gluten.
- a.2) Alimentos fortificados con gluten.
- a.3) Alimentos sin gluten.

b) Alimentos tratados con temperaturas intermedias ($100-180^{\circ}\text{C}$), almidones con gluten.

Método de referencia. Los métodos de referencia usados actualmente para la extracción de gluten son tanto los que usan la solución etanol-agua 60% como los que utilizan el Cocktail de extracción de Méndez. Para aplicar estos métodos en el ensayo seguimos los pasos de los respectivos protocolos los cuales se detallan a continuación.

Para la extracción con etanol-agua, 1 g de muestra o matriz es pesada y añadida a un tubo de 50 ml de polipropileno estéril. Se añaden 10 ml de la solución etanol-agua 60% y esta mezcla es incubada 1 h a temperatura ambiente en agitación mediante una noria (Selecta, 3000445) Tras esta incubación se centrifuga a 2.500 g (Thermos Heraeus, Megafuge 40R) durante 10 minutos a temperatura ambiente y el sobrenadante es pasado a un tubo limpio para su posterior análisis.

La solución etanol-agua 60% se preparó mezclando 312,5 ml de Etanol (Guinama) con 187.5 ml de agua bidestilada (15 MΩ/cm) y pasados a un bote de cristal.

Para la extracción mediante el Cocktail de Méndez de pesó 0,25 g de alimento o matriz añadiéndose en un tubo de 50 ml de polipropileno estéril. Se añade 2,5 ml del
5 Cocktail y se sella el tubo con parafilm. Se incuba a 50°C en un baño de agua (Raypa, BRD-4) durante 40 minutos con agitaciones periódicas. A continuación y tras atemperar la muestra a temperatura ambiente, se añaden 7,5 ml de etanol-agua al 80% incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente en una noria de agitación (SELECTA). Posteriormente se centrifuga a 2.500 g (Thermos Heraeus, Megafuge 40R) durante 10
10 minutos a temperatura ambiente, el sobrenadante es pasado a un tubo limpio para su posterior análisis. La solución de extracción compuesta por 250 mM de β-mercaptoetanol, 2M de Hidrocloruro de Guanidinio en 0.1xPBS se prepara pesando 3,8 g de Hidrocloruro de guanidinio Mr 95,53 (Fluka 50940) y añadiendo 15-18 ml de una solución de 0,1xPBS. Después se añaden 349 µl de 14,29M de β-mercaptoetanol
15 (Sigma M-6250) y se lleva hasta los 20 ml de 0,1xPBS, agitándose para su homogenización.

El 0,1xPBS se realizó diluyendo 100 veces una solución 10xPBS (1 ml de 10xPBS y llevado hasta los 100 ml con agua bi-destilada) resultando una solución a pH entre 7-8. La solución 10xPBS se realizó disolviendo 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g
20 de Na₂HPO₄ en 950 ml de agua bi-destilada enrasando posteriormente hasta 1l.

La solución etanol-agua 80% se obtiene mezclando 416 ml de etanol (Guinama) con 84 ml de agua bi-destilada.

Después de ambos protocolos el sobrenadante obtenido se analiza mediante las técnicas ELISA Sandwich R5 basado en el anticuerpo monoclonal R5 tanto en captura
25 como en el de reconocimiento, este último conjugado a Peroxidasa de rábano (HRP), ELISA Sándwich G12 basado en el anticuerpo monoclonal G12 tanto en captura como en reconocimiento, este último conjugado a Peroxidasa de rábano (HRP) y mediante cromatografía de flujo lateral basada en el anticuerpo monoclonal G12.

Los anticuerpos monoclonales G12 y R5 permiten la detección de gluten en
30 trigo, cebada, centeno y variedades de avena, presentando límite de detección de 1,5 ppm.

Método de uso de la solución de la invención. El proceso consiste en un método de extracción de gluten que combina la extracción con la solución etanol-acuosa en

presencia de arginina a 0,5 M a un pH de 7 que puede reforzarse con tampones presente en soluciones usadas convencionalmente como PBS es capaz de hacer una extracción de gluten más eficaz que las alternativas conocidas en el estado de la técnica usando componentes menos tóxicos.

5 Para llevar a cabo el proceso de extracción pesamos 0,25 g de alimento o matriz y la introducimos en un tubo de 50 ml de polipropileno estéril a la que añadimos 2,5 ml de la composición de la invención, mezclando y sellando el tubo e incubando la muestra a 50°C en un baño de agua (Raypa, BRD-4) durante 40 minutos con agitaciones periódicas mediante vórtex. Después de atemperar la muestra a temperatura ambiente,
10 añadimos 7,5 ml de solución etanol-agua al 80% e incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente en una noria de rotación (SELECTA) Posteriormente se centrifuga la muestra a 2.500 g durante 10 minutos a temperatura ambiente (Thermos Heraeus, Megafuge 40R) y el sobrenadante es traspasado a un tubo limpio para su posterior análisis.

15 En el presente ejemplo, la composición cualitativa de la solución de extracción de la invención es de 0,5M de arginina en 0,1xPBS se realiza añadiendo, en 450 ml de 0,1xPBS, 43,5 g de L-arginina (Sigma-Aldrich, A5006), y 0,5 g de Bronidox (Sigma, B8791), tras disolverse se enrasa a 500 ml.

 La solución de 0,1xPBS se prepara a partir de una solución 1xPBS diluyendo 10
20 veces (10 ml de 1xPBS y enrasando hasta 100 ml). Este 1xPBS se prepara mezclando 28 ml de la solución 25 mM de NaH_2PO_4 con 72 ml de la solución 25 mM de Na_2HPO_4 .

 La solución etanol-agua 80% se obtiene mezclando 416 ml de etanol (Guinama) con 84 ml de agua bi-destilada.

 Los resultados de la tabla I muestran claramente una mejora de la cuantificación
25 de gluten presente en la muestra o matriz utilizando la composición de la invención en todo tipo de alimentos (tratados por calor o no por calor, a altas y medias temperaturas). El incremento del gluten extraído supone de entre 20 y 200 % llegando incluso a un aumento de más del 300 % por medio del ensayo ELISA Sandwich G12 y un rango de 10 al 110 % en el ensayo ELISA Sandwich R5.

30

Tabla 1. Comparación de resultados mediante la técnica ELISA Sandwich basada en el anticuerpo G12. E/A: protocolo de extracción con solución etanol-agua al 60 %; CM:

ES 2 392 412 A1

protocolo de extracción utilizando el Cocktail de extracción de Méndez; SB: extracción con la solución con arginina de la invención.

ELISA Sandwich G12						
	Muestra	E/A (mg/kg)	CM (mg/kg)	SB (mg/kg)	% Incremento SB vs E/A	% incremento SB vs CM
Muestras con gluten > 200°C	Galleta	12,0	8,3	23,3	94	180
	Galleta	191	64,5	163	-14	152
	Chips	239	262	322	34	22
	Chips	42,5	35,9	52,8	24	47
Muestras sin gluten > 200 °C	Galleta	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
	Galleta	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
	Snacks	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
	Maiz Frito	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
Muestras 100-180°C	Pan	77	125	125	62	0,24
	Almidón	21	43	70,4	235	63
Muestras no procesadas con calor	FAPAS ₂₇₅₄	34	34,5	43,5	27	26
	FAPAS ₂₇₄₇	62	417	573	824	37
	Especie	82,2	56,3	89,4	8	58
	Harina	12	8,3	21,2	76	155

Tabla 2. Comparación de resultados mediante la técnica ELISA sándwich basada en el anticuerpo R5. E/A: protocolo de extracción con solución etanol-agua al 60 %; CM: protocolo de extracción utilizando el Cocktail de Méndez; SB: extracción con la solución con arginina de la invención.

ELISA Sandwich R5						
	Muestra	E/A (mg/kg)	CM (mg/kg)	SB (mg/kg)	% Incremento SB vs E/A	% incremento SB vs CM
Muestras con gluten > 200°C	Galleta	9,5	15,8	16,0	68,3	1,2
	Galleta	60,3	42,3	48,7	-20	15,1
	Chips	120	146	187	55,2	28,0
	Chips	30	46	47,1	57	2,3
Muestras sin gluten > 200 °C	Galleta	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
	Galleta	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
	Snacks	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
	Maiz Frito	< 1,5	< 2,6	< 2,6	-	-
Muestras 100- 180°C	Pan	67	141,5	141	111	0,21
	Almidón	39,4	65,2	78,2	98,4	19,9
Muestras no procesadas con calor	FAPAS ₂₇₅₄	47,5	47,9	48,4	1,8	1,04
	FAPAS ₂₇₄₇	299	363	451	50,8	24,2
	Especie	99	72	90,2	-8,8	25,7
	Harina	9,5	12,4	19,2	102	55

Ejemplo 3. Determinación comparada de gluten en alimentos con contenido definido tratados con distintos grados de cocción usando la solución de extracción de la invención.

10 Este ejemplo de aplicación de la solución de la invención se muestra la recuperación de gluten obtenido con la composición de la invención en muestras antes y después del tratamiento con calor, comparando los resultados obtenidos con los procesos de extracción anteriormente descritos con solo etanol-agua o con solución de Méndez, y usando la solución de extracción de la invención con arginina.

15 Materiales usados. Los materiales utilizados para la realización de este experimento son los siguientes:

- a) Pan horneado a 180°C
- b) Harinas para hacer el pan.
- c) Levadura química.

d) Gliadina PWG.

e) Panificadora.

5 Métodos de referencia. Los métodos de referencia usados actualmente para la extracción de gluten son tanto los que usan la solución etanol-agua 60% como los que utilizan el Cocktail de extracción de Méndez (ver Ejemplo 2).

10 Proceso de uso de la solución de extracción de la invención. El proceso de la invención consiste en un método de extracción de gluten que combina la extracción con la solución etanol-acuosa en presencia de un agente reductor y de agentes de interrupción de interacción de proteínas en presencia de un buffer fosfato a pH 6-8,5 o en solvente agua bi-distilada. (ver Ejemplo 1 apartado 3).

15 Los resultados obtenidos con el ELISA Sandwich G12 (Figura 2) y con el ELISA Sandwich R5 (Figura 3) muestran la cuantificación de gluten en una muestra fortificada con 50 mg/kg de gluten (añadiendo 7,1 mg de gliadina de referencia PWG a una masa final de 285 g de alimento) a través de su proceso de elaboración mediante calor. Los resultados podemos ver como utilizando la solución de la invención (SB) los valores de gluten no decaen debido al mayor grado de intensidad de tratamiento de cocción. En cambio podemos observar como utilizando el resto de soluciones de extracción se produce una disminución de la cantidad de gluten cuantificada a medida que aumenta la temperatura, subestimando por tanto la cantidad de gluten presente en la muestra.

20

Ejemplo 4. Uso de la solución de extracción para la determinación de gluten por un ensayo ELISA Competitivo en alimentos tratados con calor.

25 Este ejemplo de aplicación de la solución de la invención se muestra la recuperación de gluten obtenido con la solución de la invención en muestras antes y después del tratamiento con calor, comparando los resultados obtenidos con los procesos de extracción antes descritos y comparando los resultados obtenidos con los procesos de extracción anteriormente descritos con solo etanol-agua o con Cocktail de Méndez, y usando la solución de extracción de la invención con arginina.

30 Materiales usados. Los materiales utilizados para la realización de este experimento son los siguientes:

a) Pan horneado a 180°C

b) Harinas para hacer el pan.

- c) Levadura química.
- d) Gliadina PWG.
- e) Panificadora.

Métodos de referencia. Los métodos de referencia usados actualmente para la
5 extracción de gluten son tanto los que usan la solución etanol-agua 60% como los que
utilizan el Cocktail de extracción de Méndez (ver Ejemplo 2).

Proceso de uso de la solución de extracción de la invención. El proceso de la
invención consiste en un método de extracción de gluten que combina la extracción con
la solución etanol-acuosa en presencia de un agente reductor y de agentes de
10 interrupción de interacción de proteínas en presencia de un buffer fosfato a pH 7 o en
solvente agua bi-destilada.

Los resultados obtenidos con el ELISA competitivo G12 (Figura 4) muestran la
cuantificación en una muestra fortificada con 50 mg/kg de gluten (añadiendo 7,1 mg de
gliadina de referencia PWG a una masa final de 285 g de alimento) que ha sido
15 sometido a un proceso de elaboración mediante calor. Los resultados podemos ver como
utilizando la solución de la invención (SB) el grado de recuperación del gluten presente
se mantiene constante a pesar del mayor grado de intensidad de tratamiento de cocción.
En cambio podemos observar como utilizando el resto de soluciones de extracción se
produce una disminución de la cantidad de gluten cuantificada a medida que aumenta la
20 temperatura, siendo esta caída drástica cuando la muestras es sometida a temperatura de
180°C, subestimando por tanto la cantidad de gluten presente en la muestra.

Ejemplo 5. Uso de la solución de extracción para la determinación de gluten por tiras
inmunocromatográficas en alimentos tratados con calor.

25 Este ejemplo muestra la aplicación de la solución de la invención para la
detección de gluten por tiras inmunocromatográficas. Para ello se demuestra
experimentalmente como la detección de gluten extraído con la solución de la invención
en muestras antes y después del tratamiento con calor, mejora los resultados obtenidos
con los procesos de extracción antes descritos usando un kit de ELISA Competitivo,
30 que no puede usarse con el Cocktail de extracción tradicional de Méndez. Uno de los
aspectos que impide hacer válido un test ELISA competitivo para todo tipo de alimentos
es que al no poderse usar el Cocktail de Méndez, se desconfía de la capacidad de
detectar gluten en alimento procesados por calor. El Cocktail de Méndez tiene

componentes que inactivan el anticuerpo como al NaCl. El presente ejemplo demuestra la compatibilidad de la invención con las mediciones sensibles de gluten.

Materiales usados. Los materiales utilizados para la realización de este experimento son los siguientes:

- 5 a) Pan horneado a 180°C
 b) Harinas para hacer el pan.
 c) Levadura química.
 d) Gliadina PWG.
 e) Panificadora.

10

Métodos de referencia. Los métodos de referencia usados actualmente para la extracción de gluten son tanto los que usan la solución etanol-agua 60% como los que utilizan el Cocktail de extracción de Méndez (ver Ejemplo 2).

15 Proceso de uso de la solución de extracción de la invención. El proceso de la usa la solución de extracción de gluten que combina la extracción con la solución etanol-acuosa en presencia de arginina 0,5 M en presencia de un buffer fosfato a pH 7 o en solvente agua bi-destilada.

20 Los resultados obtenidos del análisis mediante tiras inmunocromatográficas basadas en el anticuerpo G12, de la muestra fortificada con 50 mg/kg de gluten (añadiendo 7,1 mg de gliadina de referencia PWG a una masa final de 285 g de alimento) , (Tabla 3) muestran como a medida que el alimento ha sido sometido a mas temperatura se produce una subestimación en la detección al utilizar los métodos de extracción de referencia, en cambio la detección de gluten se mantiene cuando extraemos utilizando la solución de la invención.

Tabla 3. Comparación de muestras tratadas con calor mediante tira inmunocromatográfica a distintas concentraciones y tiempos de lectura. E/A: extracción con solución etanol-agua 60%; CM: solución realizada con el Cocktail de Mendez; SB: Extracción realizada utilizando la composición de la invención

Detección de gluten en alimentos tratados con calor. Cromatografía de Flujo Lateral basadas en anticuerpo G12																		
	Muestras antes de cocción 25°C						Muestras 50 °C						Muestras 180°C					
	20 mg/kg			50 mg/kg			20 mg/kg			50 mg/kg			20 mg/kg			50 mg/kg		
	E/A	CM	SB	E/A	CM	SB	E/A	CM	SB	E/A	CM	SB	E/A	CM	SB	E/A	CM	SB
5 min.	D+	D+	D+	-	D+	D+	D+	D+	D+	-	-	-	D+	D+	D+	-	-	-
10 min.	+	+	+	D+	+	+	+	+	+	-	D+	D+	+	+	+	-	-	D+
15 min.	+	+	+	D+	+	+	+	+	+	-	D+	+	+	+	+	-	D+	+

5

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Eficacia de la extracción de gluten con etanol agua y con solución de extracción con arginina a distintas concentraciones de un alimento cocido contaminado con gluten y usando dos temperaturas distintas. La medición se realizó usando un ELISA Sandwich basado en el anticuerpo R5.

Figura 2. Comparación de muestras tratadas con calor mediante la técnica ELISA Sandwich basada en el anticuerpo monoclonal G12. E/A: extracción con solución etanol-agua 60%; CM: solución realizada con el Cocktail de Méndez; SB: Extracción realizada utilizando la composición de la invención. En la figura de arriba es la cantidad estimada extraída en ppm por el ELISA, la de abajo son porcentajes sobre la cantidad estimada que debería haber.

Figura 3. Comparación de muestras tratadas con calor mediante la técnica ELISA Sandwich basada en el anticuerpo monoclonal R5. E/A: extracción con solución etanol-agua 60%; CM: solución realizada con el Cocktail de Méndez; SB: Extracción realizada utilizando la composición de la invención. En la figura de arriba es la cantidad estimada extraída en ppm por el ELISA, la de abajo son porcentajes sobre la cantidad estimada que debería haber.

Figura 4. Comparación de muestras tratadas con calor mediante la técnica ELISA competitivo basada en el anticuerpo monoclonal G12. E/A: extracción con solución etanol-agua 60%; CM: solución realizada con el Cocktail de Méndez; SB: Extracción realizada utilizando la composición de la invención. En la figura de arriba es la cantidad estimada extraída en ppm por el ELISA, la de abajo son porcentajes sobre la cantidad estimada que debería haber.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Solución acuosa para la extracción analítica de gluten presente en alimentos ,
ingredientes alimenticios y bebidas caracterizada por contener arginina como
agente solubilizante a una concentración entre 0,1M y 2 M.
2. Solución acuosa para la extracción analítica de gluten según la reivindicación 1
con un pH comprendido entre 6 y 8,5.
- 10 3. Solución acuosa para la extracción de gluten de las reivindicaciones 1 y 2 que
contiene un agente reductor de puentes disulfuro.
4. Solución acuosa para la extracción de gluten según las reivindicaciones 1 y 2
que contiene también un tensioactivo.
- 15 5. Método para extracción analítica del gluten en alimentos usando la solución
según alguna de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado por los siguientes pasos
iniciales:
 - a. Homogenizar un gramo de muestra por cada 10 mL de dicha solución de
extracción de la reivindicación 1 a 3.
 - b. Incubar esta mezcla de 5 a 60 minutos a una temperatura desde 20°C
hasta 55°C, dependiendo de la muestra a analizar.
 - 20 c. Dejar que se ponga la mezcla a temperatura ambiente.
 - d. Mezclar 3 volúmenes por cada volumen de extracto de una solución de
etanol –agua en presencia de la composición, con un porcentaje de etanol
que puede variar entre 60-80%.
 - e. Separación del sobrenadante que contiene el gluten extraído.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que la muestra se incuba con la solución
de la composición según las reivindicaciones 1 a 4 durante al menos 5 minutos a
una temperatura comprendida entre 45 y 55°C.
7. El método de la reivindicación 5, donde la solución etanol-agua adicionada
después de la incubación con la solución de extracción de las reivindicación 1 a
30 4 presenta un porcentaje del 80% en etanol
8. El método de la reivindicación 5 donde la incubación de la mezcla compuesta
por la muestra, la solución de la invención y la solución etanol-agua se incuban
entre 2 y 60 minutos

9. Uso de la solución con la composición según las reivindicaciones 1 a 4 para determinación de gluten en alimentos, ingredientes alimenticios, y bebidas.
10. Uso de la solución según las reivindicaciones 1 a 4 para determinación de gluten mediante ensayos inmunológicos del tipo ELISA, tiras inmunocromatográficas, 5 Western blot, inmunopartículas fluorescentes, inmunopartículas magnéticas, o biosensores que usen anticuerpos.
11. Un kit para detectar gluten que comprenda la solución de las reivindicaciones 1 a 4 y componentes para hacer pruebas de ELISA para detectar péptidos del gluten.
12. Un kit para detectar gluten que comprenda la solución de las reivindicaciones 1 a 10 4, y tiras inmunocromatográficas para detectar péptidos del gluten.

Figura 1

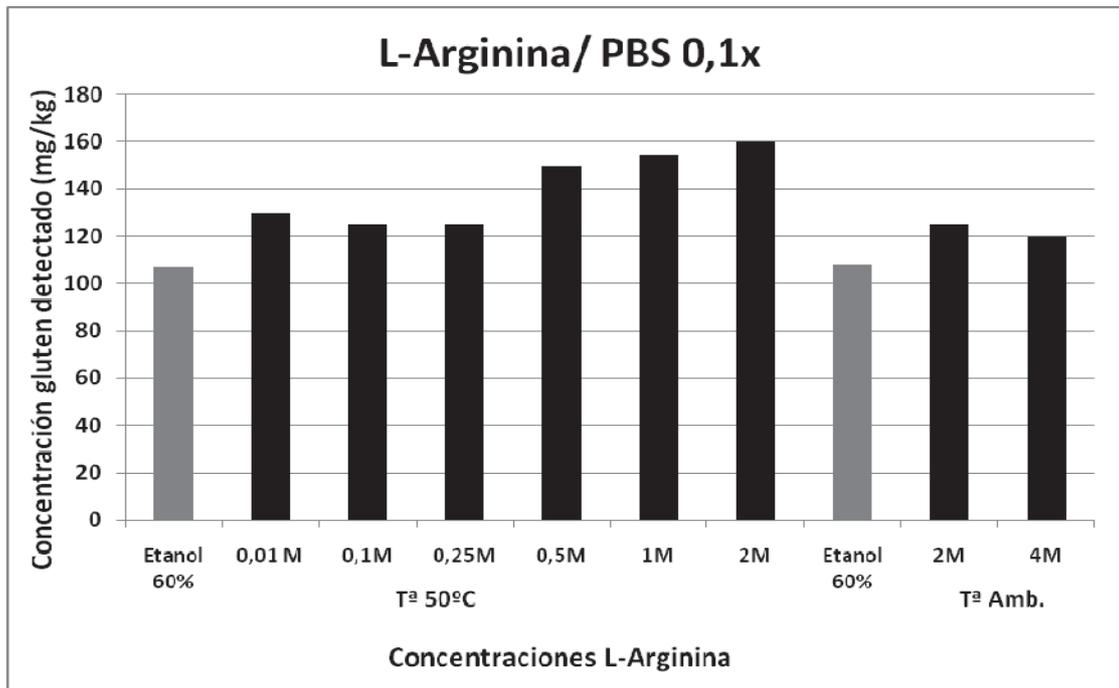


Figura 2

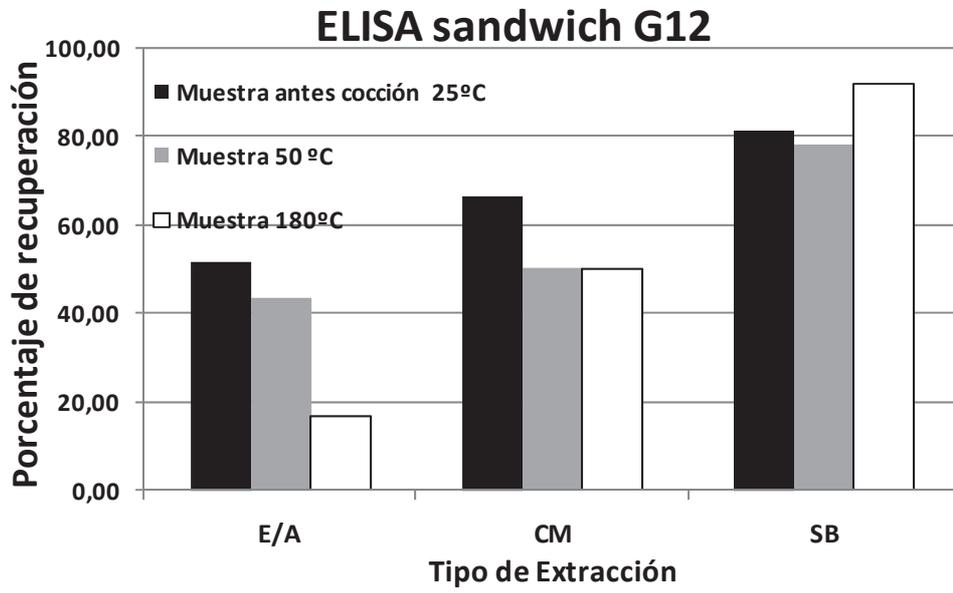


Figura 3

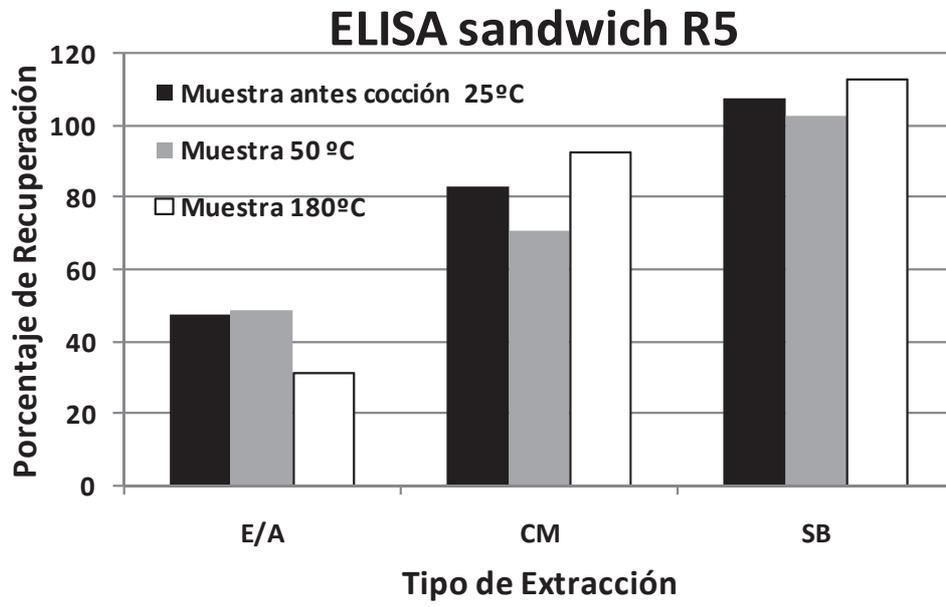
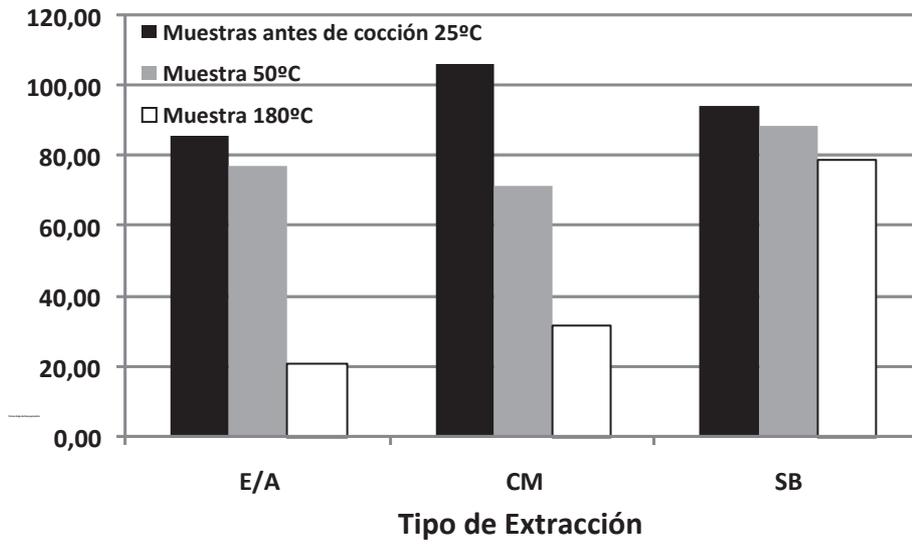


Figura 4



LISTA DE SECUENCIAS

110> Biomedal S.L.

<120> Solución para la extracción de gluten y métodos de uso

5 <130> Solución para la extracción de gluten y métodos de uso

<140> P201031612

<141> 2010-11-03

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

<211> 33

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 1

15 Leu Gln Leu Gln Pro Phe Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro

1 5 10 15

Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Leu Pro Tyr Pro Gln Pro Gln Pro Phe

 20 25 30

e



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031612

②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K1/14** (2006.01)
A23L1/015 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO 02092633 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 21.11.2002, todo el documento.	1-12
Y	ARAKAWA T. et al. "Solubility enhancement of gluten and organic compounds by arginine" International Journal of Pharmaceutics (01 mayo 2008) Vol. 355, N.º. 1-2, páginas 220-223; ISSN 0378-5173; DOI 10.1016/j.ijpharm.2007.12.009; todo el documento.	1-12
A	WO 2010018290 A1 (UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI; ICREA INSTITUCIO CATALANA DE RECERCA I ESTUDIS AVANÇATS) 18.02.2010, todo el documento.	1-12
A	WO 2007104825 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 20.09.2007, todo el documento.	1-12

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 n.º:

Fecha de realización del informe
14.11.2012

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/4

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

C07K, A23L

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, bases de texto completo TXT, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/ELSEVIER, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.11.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	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	WO 02092633 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS)	21.11.2002
D02	ARAKAWA T. et al. "Solubility enhancement of gluten and organic compounds by arginine" International Journal of Pharmaceutics (01 mayo 2008) Vol. 355, N°. 1-2, páginas 220-223; ISSN 0378-5173; DOI 10.1016/j.ijpharm.2007.12.009.	01 MAYO 2008

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12, es una solución acuosa para la extracción analítica de gluten presente en alimentos, ingredientes alimenticios y bebidas. La solución contiene arginina (0.1M-2M), un agente reductor de puentes disulfuro y un tensioactivo, teniendo la solución un pH de entre 6 y 8.5 (reiv. 1-4). Es también objeto de la invención un método para la extracción analítica de gluten mediante la utilización de dicha solución (reiv. 5-10) y un kit para detectar gluten que contiene la solución de la invención (reiv. 11-12).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga una composición para extraer gluten de los alimentos, tanto procesados por calor como no procesados, que contiene un agente reductor de puentes disulfuro (2-mercaptoetanol, ditiotreitól,...) y un agente disociante (hidrocloruro de guanidina, urea,...) en un tampón de pH comprendido entre 7 y 8. En este documento también se divulga un método para extraer el gluten, basado en la utilización de dicha composición, y que consta de varias etapas: (1) Mezclado de la muestra con la composición e incubar a una temperatura de entre 37°C y 50°C (concretamente a 50°C) durante 30 a 60 minutos (concretamente 40 min), para luego dejar enfriar a temperatura ambiente. (2) Añadir una solución acuosa de etanol que tiene un contenido de etanol del 80% (ejemplo 1.3) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. (3) Centrifugación y separación del sobrenadante que contiene el gluten extraído para su posterior análisis y cuantificación por ELISA. En este documento también se divulga un kit con los componentes necesarios para la realización del método descrito.

El documento D01 es el más cercano del estado de la técnica. En él se divulga tanto una composición para extraer el gluten, como un método para su extracción. La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la invención, es la utilización de la arginina como solubilizador del gluten. Sin embargo, este efecto técnico de la arginina ya está divulgado en el documento D02, que describe el efecto solubilizante de la arginina para sustancias altamente insolubles, como el gluten. En este documento D02 se divulga como aumenta la solubilidad del gluten en presencia de distintas concentraciones de arginina a pH7, desde 0.2M (con el que se alcanza una solubilidad del 46%), hasta alcanzar el máximo de solubilidad a una concentración de 2M de arginina (con el que se alcanza un 80-90%) (tabla 1, figura 1 y apartado 3.1 "Gluten solubility").

Por lo tanto, según lo divulgado en los documentos D01 y D02, resulta obvio para un experto en la materia utilizar la arginina como agente solubilizador o disociante, en vez del hidrocloruro de guanidina o la urea para obtener un mejor rendimiento y evitar la toxicidad y el olor de los compuestos que se vienen utilizando en el estado de la técnica a la hora de solubilizar el gluten.

En consecuencia, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-12, aunque es nueva, en el sentido del art. 6.1 de la Ley 11/1986, carece de actividad inventiva según el art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes.