(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 414 279**

(21) Número de solicitud: 201300560

(51) Int. CI.:

A23J 1/06 (2006.01)
A23J 3/32 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación:

07.06.2013

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

18.07.2013

Fecha de la concesión:

13.01.2014

(45) Fecha de publicación de la concesión:

20.01.2014

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)
C/ San Francisco 3
33006 Oviedo (Asturias) ES

(72) Inventor/es:

ÁLVAREZ GARCÍA, Carlos;
RENDUELES DE LA VEGA, Manuel y
DÍAZ FERNÁNDEZ, Mario

(54) Título: **Procedimiento para la producción de péptidos y aminoácidos mediante hidrólisis ácida y básica en paralelo**

(57) Resumen:

Procedimiento para la producción de péptidos y aminoácidos mediante hidrólisis ácida y básica en paralelo a partir de hemoglobina purificada, procedente de animales. Posteriormente, el medio ácido y básico se mezclan para detener las reacciones, y los productos obtenidos (péptidos y aminoácidos) son purificados. La invención tiene por objeto proporcionar un procedimiento adecuado para subsanar la pérdida de aminoácidos que tiene lugar cuando la hemoglobina es hidrolizada empleando únicamente ácidos o álcalis de forma independiente, a la vez que se consigue un importante ahorro de reactivos, ya que tanto los ácidos como los álcalis son empleados como agentes de hidrólisis y neutralizantes.

De aplicación en los sectores de la agricultura, química y farmacia, medioambiental o alimentario, y en particular en aquellas industrias agroalimentarias o cárnicas que generan un exceso de sangre y que requieren un método eficiente para el post-procesado de subproductos.

ES 2 414 279 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS Y AMINOÁCIDOS MEDIANTE HIDRÓLISIS ÁCIDA Y BÁSICA EN PARALELO

La invención se refiere a un procedimiento para la producción de péptidos y aminoácidos a partir de hemoglobina purificada, procedente de animales, empleando para ello ácidos minerales y álcalis en un proceso de hidrólisis paralela. Posteriormente, el medio ácido y básico se mezclan para detener las reacciones, y los productos obtenidos (péptidos y aminoácidos) son purificados. La invención tiene por objeto proporcionar un procedimiento adecuado para subsanar la pérdida de aminoácidos que tiene lugar cuando la hemoglobina es hidrolizada empleando únicamente ácidos o álcalis de forma independiente, a la vez que se consigue un importante ahorro de reactivos, ya que tanto los ácidos como los álcalis son empleados como agentes de hidrólisis y neutralizantes.

La invención resulta de aplicación en la obtención de péptidos y aminoácidos a partir de hemoglobina purificada, principalmente en los sectores de la agricultura, química y farmacia, medioambiental o alimentario, y en particular en aquellas industrias agroalimentarias o cárnicas que generan un exceso de sangre y que requieren un método eficiente para el post-procesado de subproductos.

ESTADO DE LA TÉCNICA

En la actualidad, la hemoglobina purificada puede ser hidrolizada siguiendo procesos enzimáticos, hidrólisis química ácida (con ácidos orgánicos o minerales), hidrólisis química básica o hidrólisis a muy altas presiones y temperaturas.

En el caso de las reacciones enzimáticas, se obtienen péptidos de manera predecible en cuanto a tamaño y secuencia sin pérdidas por degradación de aminoácidos; sin embargo, la concentración de proteína que puede ser tratada suele situarse habitualmente en un máximo de 5-50 g/L. (Yike Y., Jianen H., Xuefeng B., Yuguang D. & Bingcheng L. Preparation and function of oligopeptide-enriched hydrolysate from globin by pepsin. Process Biochem., 2006, 41, 1589-1593; Tauzin, J., Miclo, L., Roth, S., Mollé, D. & Gaillard, J.-L. Tryptic hydrolysis of bovine αS2-

casein: identification and release kinetics of peptides. Int. Dairy J., 2003, 13, 15–27; Su, R.-X., Qi, W. & He, Z.-M. Time-dependent nature peptic hydrolysis of native bovine hemoglobin. Eur. Food Research Tech., 2007, 225, 637-647). Además, es necesario un control muy estricto y continuo del pH del medio, el cual varía constantemente a medida que la hidrólisis avanza. La temperatura es otro parámetro esencial, debido a que sólo dentro de un margen estrecho de valores de temperatura se obtienen buenos rendimientos de hidrólisis. Una vez finalizada la reacción, la enzima empleada debe ser neutralizada en un paso posterior del proceso.

Cuando se emplean altas presiones y altas temperaturas, el producto final está compuesto principalmente por aminoácidos y por productos de degradación, como ácidos orgánicos y amoniaco (Rogalinski, T., Herrmann, S., Brunner, G., Production of amino acids from bovine serum albumin by continuous sub-critical water hydrolysis. Journal of Supercritical Fluids, 2005, 36: 49-58.). Con las condiciones de trabajo que se emplean habitualmente (15-27 MPa y 250-300 °C), no es posible obtener péptidos de alto o bajo peso molecular. Además la tasa de transformación de proteína en aminoácidos se sitúa en torno al 65% (Esteban, M. B.; García, A. J.; Ramos, P.; Márquez, M. C. Subcritical water hydrolysis of hog hair for amino acid production. Bioresour. Technol. 2010, 101, 2472–2476; Rogalinski, T.; Herrmann, S.; Brunner, G. Production of aminoacids from bovine serum albumin by continuous sub-critical water hydrolysis. J. Supercrit. Fluids 2005, 36, 49–58; Xian, Z.; Chao, Z.; Liang, Z.; Cheng, H. Amino acids production from fish proteins hydrolysis in subcritical water. Chin. J. Chem. Eng. 2008, 16, 456–460).

En el caso de emplearse ácidos como agentes hidrolizantes, se produce una degradación de ciertos aminoácidos: asparagina y glutamina son transformados en ácido aspártico y glutámico, mientras que el triptófano y la cisteína se destruyen por completo (Fountoulakis M., Hans-Werner L. Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. Journal of Chromatography A, 1998, 826, 109–134).

En el segundo caso, cuando se emplea una base para hidrolizar proteínas, se causa la pérdida por degradación de serina, treonina, arginina y cisteína; y la asparagina y la glutamina son convertidas de igual modo en aspartato y glutamato (Ravindran, G. & Bryden, W.L. Tryptophan determination in proteins and feedstuffs

by ion exchange chromatography. Food Chemistry, 2004, 89, 309–314). Las cantidades procesadas y el control de los parámetros de la reacción son iguales que en el caso anterior. La pérdida de aminoácidos es un grave inconveniente, ya que algunos de ellos son esenciales y su carencia disminuye el valor nutricional del hidrolizado obtenido.

Como ventajas, los métodos químicos no precisan un control del pH y el rango de temperaturas a las que se aplica es mucho más amplio. Además, pueden procesarse hasta 500 g/L de sustrato (US 2.657.232 A; US 4.874.893 A).

Habitualmente estos procesos químicos son empleados para la hidrólisis completa de las proteínas hasta obtener aminoácidos libres, nunca para la producción de péptidos con un tamaño final predecible. Un proceso que permita obtener péptidos con un tamaño predecible es significativo debido a que el tamaño de los mismos determina sus propiedades funcionales y antioxidantes. Por tanto, un método que permita determinar el tamaño final del hidrolizado es importante para conocer sus propiedades finales. Se sabe que péptidos de más de 2 kDa presentan muy buenas propiedades funcionales, mientras que los de menos de 1 kDa son muy buenos antioxidantes (Clemente, A., 2000, Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. Trends in Food Science and Technology, 11, 254–262; Suetsuna, K., Ukeda, H., & Ochi, H.,2000, Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. The Journal of Nutrition Biochemistry, 11(3), 128-131; Moure, A., Domínguez, H., & Parajo, J.C., 2006, Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochemistry. 41, 447-456). Una vez finalizado el proceso, el ácido debe ser neutralizado empleando álcalis o por dilución en agua, y lo mismo ocurre cuando se emplea álcali como hidrolizante, lo que incrementa notablemente la complejidad y el coste del proceso.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un proceso para la producción de péptidos y aminoácidos libres a partir de hemoglobina purificada, mediante la aplicación de

ácidos y álcalis como agentes hidrolizantes de forma paralela, con una neutralización y purificación posterior de los productos obtenidos.

A los efectos de la presente invención y su descripción, se entiende por hidrólisis la ruptura ocurrida en un enlace peptídico mediante la acción de un agente hidrolizante, bien sea un ácido o un álcali. A los efectos de la presente invención y su descripción, se entiende por agente hidrolizante a los ácidos o álcalis añadidos a la disolución de proteínas que ocasionan la ruptura del enlace peptídico.

El procedimiento objeto de la invención para la producción de péptidos y aminoácidos a partir de hemoglobina comprende las siguientes etapas:

a) Adición de ácido y álcali a dos disoluciones de hemoglobina purificada hasta alcanzar una concentración de 6 M de cada uno de los agentes hidrolizantes. Calentar estas mezclas hasta una temperatura entre los 50 y los 120 °C y mantenerlas en agitación constante durante un tiempo de agitación de entre 6 y 24 horas, dependiendo de la temperatura empleada. Preferentemente, la temperatura se fija en el valor adecuado bien sea para producir péptidos (50 °C), mezcla de péptidos y aminoácidos (80 °C) o solo aminoácidos (110 °C). Se deja transcurrir la reacción durante un periodo de tiempo tal que es de 24 horas cuando se emplean 50 °C y 110 °C y de 6 horas cuando se emplean 80 °C.

b) Mezclar las disoluciones ácida y básica al término de la hidrólisis hasta alcanzar un pH entre 1 y 2.

c) Enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente. A los efectos de la presente invención y su descripción, el término "temperatura ambiente" debe interpretarse como la temperatura que se puede medir con un termómetro y que se toma del ambiente actual.

d) Separar la fracción sólida (rica en péptidos) y la fracción liquida (rica en aminoácidos) mediante centrifugación o filtración. El producto una vez alcanza la temperatura ambiente es filtrado y se obtiene así un permeado rico en sales disueltas (como por ejemplo sulfato sódico) y en aminoácidos libres; y un retenido que contiene los péptidos y sal

precipitada. Esto es debido a que los péptidos son insolubles a este bajo pH, cosa que no les ocurre a los aminoácidos.

e) Eliminar las sales en la fracción sólida o retenido mediante lavados con agua ácida o destilada, eliminar las sales en la fracción líquida o permeado mediante su precipitación con etanol y purificar ambas fracciones mediante filtración, decantación o centrifugación.

f) Eliminar el exceso de agua mediante secado.

En una realización preferida, la hemoglobina empleada procede de un animal. En una realización más preferida, el animal es del tipo porcino, vacuno, ovino, caprino, aviar o equino. Aún más preferidamente la hemoglobina se obtiene de la sangre de animales sacrificados en macelos.

En otra realización preferida, una vez agregado el ácido o el álcali en la etapa a) la concentración de hemoglobina de ambas mezclas es de 50 mg/mL.

En otra realización preferida, la relación de volúmenes de reacción de la etapa a) es de dos partes de disolución básica y una parte de disolución ácida.

En una realización específica, la temperatura de la etapa a) para producir péptidos es de 50 °C. En una realización más específica, el tiempo de agitación de la etapa a) es de 24 horas.

En otra realización específica, la temperatura de la etapa a) para producir una mezcla de péptidos y aminoácidos es de 80 °C. En una realización más específica, el tiempo de agitación de la etapa a) es de 6 horas.

En otra realización específica, la temperatura de la etapa a) para obtener aminoácidos es de 110 °C. En una realización más específica, el tiempo de agitación de la etapa a) es de 24 horas.

En otra realización específica, el agua de lavado de la fracción sólida en la etapa e) es destilada o con un pH de entre 1 y 2. Preferentemente, el retenido (rico en péptidos) del paso e) es lavado sucesivamente con agua destilada o ácida, manteniendo el pH en valores dentro del rango de 1 a 2 unidades. El fin es eliminar los restos de sales precipitadas por medio de su disolución. Entre cada lavado se puede

realizar un nuevo filtrado o centrifugado. El retenido final puede ser secado o disuelto en disoluciones de un pH 7 o superior, en donde los péptidos ya separados de los aminoácidos y de las sales son completamente solubles.

En una realización preferida, la concentración de etanol empleado en la etapa e) es del 15% v/v. Preferentemente, al permeado rico en aminoácidos obtenido en el paso e) se le añade etanol al 96% hasta obtener una concentración final del 15%. Con esto se consigue precipitar la sal (por ejemplo sulfato sódico) presente, mientras que los aminoácidos siguen en disolución. A continuación, bien mediante filtración, decantación o centrifugación, se recupera un sobrenadante rico en aminoácidos libres que puede ser secado o concentrado.

En otra realización preferida, la filtración de la fase sólida en la etapa e) es llevada a cabo por una membrana de 20 micras de diámetro de poro.

En otra realización preferida, la separación de la fase sólida mediante centrifugación en la etapa e) es llevada a cabo por una centrifugación durante 10 minutos con una fuerza de 10.000 g.

El rendimiento, entendido como gramos de hidrolizado por litro de reacción, obtenido con el proceso aquí descrito es ampliamente superior al que se obtiene empleando enzimas, ya que se multiplica hasta por 10 la concentración de proteína empleada. Comparado con los procesos químicos existentes, donde solo se emplea ácido o base como agente hidrolizante, se consigue un mayor reaprovechamiento de los reactivos empleados, ya que ambos tienen el doble papel de agente hidrolizante y agente neutralizante y, por tanto, la misma cantidad de ácido produce el triple de hidrolizado final y la misma cantidad de base produce un 50% más de producto final.

Desde un punto de vista nutricional, los hidrolizados enzimáticos son más completos ya que no existe degradación de aminoácidos. Los hidrolizados obtenidos químicamente son deficientes en varios aminoácidos según el método seguido, ya que degradan por completo las proteínas a aminoácidos y algunos se pierden irremediablemente. Sin embargo, el proceso descrito en esta invención permite la conservación de todos los aminoácidos, ya que se encuentran contenidos en los péptidos, mientras que las degradaciones referidas a los aminoácidos libres se ven

minimizadas; esto es porque aminoácidos degradados en el proceso ácido son conservados en el proceso básico y viceversa. Con la invención propuesta, solo dos aminoácidos esenciales están ausentes en su forma libre, treonina y metionina, que además son minoritarios en la molécula de hemoglobina (18 y 4 residuos respectivamente de un total de 578).

Con respecto a los métodos clásicos de hidrólisis química, en los que la hidrólisis se llevaba a cabo hasta obtener una completa degradación de la proteína en aminoácidos libres, el proceso aquí presentado, mediante el control de la temperatura y del tiempo de reacción, puede ser empleado para producir péptidos de diferente tamaño.

Una aplicación preferente de este método se refiere al uso de hemoglobina procedente de la sangre de animales de abasto. La sangre es uno de los subproductos más abundantes de la industria cárnica, la cual se produce en grandes volúmenes y plantea un problema para su procesado y un grave problema medioambiental. La aplicación del método de la invención permite aprovechar grandes cantidades de sangre y producir un hidrolizado de alto valor nutritivo que puede ser aplicado como ingrediente de piensos o formulaciones de alimento para mascotas.

Con la presente invención se plantea un método de hidrólisis de proteínas y la posterior separación de los productos obtenidos en base a su solubilidad y tamaño. En este proceso se consigue además obtener péptidos con un tamaño predecible. El método de la presente invención proporciona una solución tecnológica capaz de procesar las grandes cantidades de hemoglobina que se generan diariamente en los macelos, disminuyendo la pérdida del valor nutricional de los productos causada por la degradación de ciertos aminoácidos inherente al proceso en sí. La hidrólisis de grandes cantidades de hemoglobina, con el método aquí presentado, es capaz de absorber gran parte del exceso de sangre generado y además revalorizar este subproducto al obtenerse un hidrolizado de una forma barata y de amplia aplicación en la alimentación de animales de abasto o de mascotas.

La invención resulta de aplicación en la obtención de péptidos y aminoácidos a partir de proteínas de origen animal, principalmente en los sectores de la agricultura,

química y farmacia, medioambiental o alimentario, y en particular en aquellas industrias agroalimentarias o cárnicas que generan un exceso de subproductos (como la sangre) y que requieren un método eficiente para el post-procesado de los mismos.

EXPLICACIÓN DE UNA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Para una mejor comprensión de la presente invención, a continuación se describe el siguiente ejemplo de realización preferente descrito en detalle, que debe entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

Se realizó una hidrólisis química ácida y básica en paralelo a pequeña escala a partir de una muestra de hemoglobina de porcino purificada. La pureza de dicha proteína era del 98%.

Por un lado se disolvieron 7,5 gramos de hemoglobina en 100 mL de agua (disolución A); por otro lado, 15 gramos de hemoglobina se disolvieron en 120 mL de agua (disolución B). Ambas disoluciones fueron calentadas con constante agitación y cuando alcanzaron una temperatura de 40 °C se agregaron 50 mL de ácido sulfúrico concentrado (18 M) a la disolución A y 180 mL de hidróxido sódico (10 M) a la disolución B. Hay que tener en cuenta la gran cantidad de calor que genera la dilución de estos compuestos en agua, llegando a alcanzar temperaturas de 70 u 80 °C. Con estas cantidades se obtuvieron 150 mL de la disolución A en la que había 50 g/L de hemoglobina y H_2SO_4 6M; y 300 mL de la disolución B a la misma concentración de hemoglobina y 6M de NaOH.

Se fijó la temperatura en 50 °C, evitando en lo posible la evaporación de agua para no alterar las concentraciones de proteínas ni de ácido o base. Se mantuvo en constante agitación durante 24 horas, al final de las cuales se alcanzó la máxima producción de péptidos (74%) y el peso molecular medio deseado (16 kDa en el caso de emplear ácido sulfúrico y 13 kDa en el caso del hidróxido sódico).

En este punto se detuvo el control de temperatura y se procedió a traspasar los 150 mL de la disolución A y los 300 mL de la disolución B a un depósito agitado. La adición ha de hacerse de manera lenta y controlada debido a la gran cantidad de calor

que se genera. La mezcla estaba calculada de tal modo que el pH final de la disolución C (disolución A más disolución B) estuviera situado entre los valores 1 y 2. Se dejó enfriar está disolución C hasta alcanzar la temperatura ambiente, sin detener en ningún momento la agitación.

Una vez alcanzada la temperatura ambiente se recuperó la disolución C. Se pudo observar cómo aparecía una fracción sólida en suspensión, formada por parte de los péptidos producidos durante la hidrólisis. A continuación, mediante una filtración por un filtro de 20 micras de diámetro de poro, se separó la fracción sólida o retenido (compuesta por péptidos no solubles y sulfato sódico precipitado) de la fracción líquida o permeado (compuesta por agua, sulfato sódico en disolución y aminoácidos libres). A partir de estas dos fracciones se obtuvieron dos productos diferentes que se purificaron con diferentes procedimientos.

I- Para recuperar los péptidos de la fracción sólida, se hizo un lavado con agua destilada para eliminar los restos de sales de sulfato. Para ello se añadieron 150 mL de agua destilada al sólido, se agitó durante 10 minutos y a continuación o bien se puede filtrar, o bien centrifugar para eliminar con la fase líquida los excesos de sales de sulfato formados durante la neutralización. En este caso concreto se realizó una filtración a través de un poro de 20 micras. Este proceso se repitió 3 veces. Al final se obtuvo un sólido que en peso seco estaba formado por más de un 90% de péptidos/proteína. Éste se secó por corrientes de aire caliente.

II- Para recuperar los aminoácidos de la fracción líquida, se precipitó el sulfato de sodio mediante la adición de etanol. Para ello se añadió etanol al 96% hasta alcanzar una concentración final del 15% (unos 18 mL de etanol por cada 100 mL de fracción líquida). Inmediatamente se obtuvo un precipitado blanco compuesto por sulfato de sodio. El sobrenadante, rico en aminoácidos, puede ser recuperado por filtración, decantación o centrifugación. Una vez obtenido puede ser secado por los métodos habituales (corriente de aire caliente, liofilización, etc). En este caso concreto, el medio rico en aminoácidos fue secado en una

estufa a 60 ºC hasta su completo secado y el polvo resultante se recogió a un recipiente herméticamente cerrado.

El rendimiento final se define como la masa de cada producto obtenida con respecto a la masa de la hemoglobina inicial. En este caso el rendimiento que se obtuvo al final de la hidrólisis fue el siguiente: 5% de aminoácidos (1,1 gramos) y 74% de péptidos (16,6 gramos), cuya composición era la siguiente según el tamaño de los péptidos: 2% de entre 40 y 50 kDa; 5 % entre 30 y 40 kDa; 16% entre 20 y 30 kDa; 58% entre 10 y 20 kDa y 19% menores de 10 kDa. Este rendimiento obtenido es muy alto, ya que el grado de conversión es muy elevado, así como la cantidad de sustrato procesado. Además, se obtienen péptidos de diferente tamaño y de manera controlada. Finalmente, con la aplicación de este método se consigue una mayor conservación de los aminoácidos originalmente presentes en la proteína sustrato.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la producción de péptidos y aminoácidos a partir de hemoglobina que comprende las siguientes etapas:
   a) adición de ácido y álcali a dos disoluciones de hemoglobina purificada hasta alcanzar una concentración de 6 M de cada uno de los agentes hidrolizantes, calentar estas mezclas hasta una temperatura entre los 50 y los 120 ºC y mantenerlas en agitación constante durante un tiempo de agitación de entre 6 y 24 horas, dependiendo de la temperatura empleada;
   b) mezclar las disoluciones ácida y básica al término de la hidrólisis hasta alcanzar un pH entre 1 y 2;
   c) enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente;
   d) separar la fracción sólida (rica en péptidos) y la fracción liquida (rica en aminoácidos) mediante centrifugación o filtración;
   e) eliminar las sales en la fracción sólida mediante lavados con agua ácida o destilada, eliminar las sales en la fracción líquida mediante su precipitación con etanol y purificar ambas fracciones mediante filtración, decantación o centrifugación;
   f) eliminar el exceso de agua mediante secado.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la hemoglobina empleada procede de un animal.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2 caracterizado por que el animal es del tipo porcino, vacuno, ovino, caprino, aviar o equino.
4. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que una vez agregado el ácido o el álcali en la etapa a) la concentración de hemoglobina de ambas mezclas es de 50 mg/mL.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que el ácido es ácido sulfúrico y el álcali es hidróxido sódico.
6. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la relación de volúmenes de reacción de la etapa a) es de dos partes de disolución básica y una parte de disolución ácida.

7. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la temperatura de la etapa a) para producir péptidos es de 50 °C.

8. Procedimiento, según la reivindicación 7, caracterizado por que el tiempo de agitación de la etapa a) es de 24 horas.

9. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la temperatura de la etapa a) para producir una mezcla de péptidos y aminoácidos es de 80 °C.

10. Procedimiento, según la reivindicación 9, caracterizado por que el tiempo de agitación de la etapa a) es de 6 horas.

11. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la temperatura de la etapa a) para obtener aminoácidos es de 110 °C.

12. Procedimiento, según la reivindicación 11, caracterizado por que el tiempo de agitación de la etapa a) es de 24 horas.

13. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que el agua de lavado de la fracción sólida en la etapa e) es destilada o con un pH de entre 1 y 2.

14. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la concentración de etanol empleado en la etapa e) es del 15% v/v.

15. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la filtración de la fase sólida en la etapa e) es llevada a cabo por una membrana de 20 micras de diámetro de poro.

16. Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por que la separación de la fase sólida mediante centrifugación en la etapa e) es llevada a cabo por una centrifugación durante 10 minutos con una fuerza de 10.000 g.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201300560

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 07.06.2013

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	ES 2289937 A1 (TECNOAMYN S L) 01.02.2008, todo el documento.	1-16
A	WO 2013004865 A2 (APC EUROP S A et al.) 10.01.2013, todo el documento.	1-16
A	ES 2004126 A6 (FLORK LAB SA) 01.12.1988, todo el documento.	1-16
A	PEREZ-GALVEZ RAUL et al. Bi-objective optimisation of the enzymatic hydrolysis of porcine blood protein. Biochemical Engineering Journal. FEB 2011. Vol. 53 No: 3 Págs: 305-310 ISSN 1369-703X (print). ISSN 1873-295X (electronic).	1-16

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	**Examinador**	**Página**
03.07.2013	J. Manso Tomico	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23J1/06 (2006.01)
A23J3/32 (2006.01)
C07K1/12 (2006.01)
C12P21/06 (2006.01)

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

A23J, C07K, C12P

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, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.07.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-16	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-16	**SI**
	Reivindicaciones		**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	ES 2289937 A1 (TECNOAMYN S L)	01.02.2008
D02	WO 2013004865 A2 (APC EUROP S A et al.)	10.01.2013
D03	ES 2004126 A6 (FLORK LAB SA)	01.12.1988
D04	PEREZ-GALVEZ RAUL et al. Bi-objective optimisation of the enzymatic hydrolysis of porcine blood protein. Biochemical Engineering Journal. FEB 2011. Vol. 53 No: 3 Págs: 305-310 ISSN 1369-703X (print). ISSN 1873-295X (electronic).	31.01.2011

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 presente solicitud divulga un procedimiento para producción de péptidos y aminoácidos a partir de hemoglobina, empleando para ello ácidos minerales y álcalis en un proceso de hidrólisis paralela.
En concreto las reivindicaciones 1-16 caracterizan el procedimiento por consistir en la preparación de sendas disoluciones de hemoglobina. A una de ellas, disolución A, se le añade ácido sulfúrico 18M, y a la otra, disolución B se le añade hidróxido sódico 10M. En estas condiciones se lleva a cabo la hidrólisis a una temperatura de 50ºC, durante 24h. En este punto del procedimiento se mezclan ambas disoluciones obteniendo una tercera disolución C, que se deja enfriar prosiguiendo en agitación, y que contiene finalmente dos fases: unas sólida, conteniendo péptidos, y una líquida, conteniendo aminoácidos.
Los documentos del estado de la técnica muestran distintos procesos de hidrólisis química para la transformación de la sangre en una proteína hidrolizada.
D01 divulga el tratamiento que se da a la hemoglobina de la sangre de animales de abastos, una vez separada de la parte plasmática de la sangre. La hidrólisis en un reactor comienza con agitación y añadiendo ácido clorhídrico hasta llegar a pH 2, e inmediatamente elevar con sosa cáustica desde pH 4.8 a 5.2 donde se detiene la agitación dependiendo de la calidad de la sangre y se efectúa la toma de muestras para observar la calidad del precipitado.
D02 divulga un método de hidrólisis de proteínas para la obtención de un suplemento alimenticio mediante hidrólisis ácida o mediante hidrólisis alcalina.
D03 divulga un procedimiento industrial de preparación de aminoácidos por hidrólisis de proteínas en un medio de acido sulfúrico 12N Y 100ºC de temperatura.
D04 divulga un método de hidrólisis de proteínas procedente de sangre porcina haciendo uso de la Alcalasa. Se diseñó un experimento para optimizar los tres factores principales de la reacción: pH, temperatura y relación enzima-sustrato. El mayor grado de hidrólisis (28,89%) se obtuvo a un pH de 6,24 y a una temperatura 54,2 ºC y relación enzima-sustrato de 10%.
Ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga un procedimiento de obtención de péptidos y aminoácidos a partir de hemoglobina como el que aparece en la presente solicitud, por lo que las reivindicaciones 1-16 parecen cumplir con el requisito de novedad y tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.
Tomando en consideración D01 como el documento del estado de la técnica más cercano al objeto de la solicitud, la diferencia entre ambos sería la hidrólisis en paralelo en dos disoluciones separadas, una en medio ácido y otra en medio básico, y la posterior mezcla de ambas disoluciones. El efecto técnico producto de esa diferencia sería la obtención de péptidos y aminoácidos de diferente tamaño con alto rendimiento, y de manera controlada. Así pues el problema técnico que plantea la presente invención sería la provisión de un procedimiento de obtención de péptidos de distintos tamaños y aminoácidos, de manera controlada, a partir de hemoglobina por hidrólisis química. La solución sería la hidrólisis en paralelo en dos disoluciones. Ninguno de los documentos del estado de la técnica permiten deducir de manera obvia, tomados solos o en combinación el procedimiento de las reivindicaciones 1-16, por lo que parecen cumplir con el requisito de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.