

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 441 414**

51 Int. Cl.:

A23L 1/00 (2006.01)
A23L 1/05 (2006.01)
A23L 1/318 (2006.01)
A23G 3/00 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 47/04 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.09.2003 E 03798470 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1543732**

54 Título: **Preparación enzimática y procedimiento para producir alimentos que utiliza la misma**

30 Prioridad:

26.09.2002 JP 2002281695

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.02.2014

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**ISHIDA, RIKIYA;
UDA, MIKA y
KUMAZAWA, YOSHIYUKI**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 441 414 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

Preparación enzimática y procedimiento para producir alimentos que utilizan la misma.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a una preparación enzimática que contiene transglutaminasa y a un procedimiento para obtener productos alimenticios que utilizan la misma. Más particularmente, la invención se refiere a una preparación enzimática que contiene 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que desplaza el pH de la preparación enzimática cuando se disuelve en solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime, y un procedimiento para obtener productos alimenticios utilizando la preparación enzimática.

En la presente exposición (incluyendo las reivindicaciones); el término colágeno incluye gelatina. A causa de que es difícil discriminar uno de otro el colágeno y la gelatina, habitualmente, el término colágeno incluye habitualmente la gelatina. Por tanto, el término colágeno se define tal como se describe anteriormente.

Antecedentes de la técnica

Se han emitido numerosos informes sobre la técnica para aplicar los efectos de la reacción de reticulación en varias proteínas mediante la transglutaminasa a ámbitos alimentarios, productos medicinales y químicos. Entre ellos, se han llevado a cabo exhaustivos trabajos de investigación en una técnica que utiliza la ventaja que consiste en emplear colágeno (que incluye gelatina tal como se ha descrito anteriormente) y transglutaminasa en combinación; y que pertenecen a los ámbitos técnicos ampliamente aplicables.

Por ejemplo, se han conocido las invenciones siguientes: un procedimiento para obtener colágeno modificado que incluye una etapa de reforzamiento de la reticulación molecular intercolagénica con transglutaminasa (patente japonesa nº 2897780; invenciones de gel de gelatina, de alimentos tipo gel y recubrimientos gelatinosos con gran resistencia térmica y procedimientos para producirlos (documentos JP-A-6-98743, 7-227228 y patente japonesa nº 2866746; y un procedimiento para obtener alimentos reestructurados con efectos intensos de unión, utilizando una combinación de transglutaminasa y colágeno (JP-A-10-70961).

Además del ámbito de los productos alimentarios, se han emitido informes, adicionalmente, con respecto a un producto aromático de colágeno de tipo gel, con suficiente fuerza y resistencia térmica, así como también un procedimiento para su producción (JP-A-9-70428). Tal como se ha descrito anteriormente, las ventajas obtenidas de la utilización de transglutaminasa y colágeno combinados, presentan valores aplicables muy altos. Adicionalmente, dicha técnica es muy ventajosa.

A causa de que el colágeno posee una reactividad de transglutaminasa muy intensa, sin embargo, el aumento en la viscosidad y la tasa de solidificación por enfriamiento de las soluciones de transglutaminasa y colágeno mezcladas, son característicamente muy rápidas.

En caso de la producción de alimentos de tipo gel o reestructurados, por tanto, emergen diversas restricciones durante los procedimientos de producción, debido a que la solidificación de la transglutaminasa progresa inmediatamente después de que la transglutaminasa se mezcla con el colágeno.

En el caso de que se tenga la intención de que un material alimenticio sólido se disperse en una solución mezcla de transglutaminasa y colágeno, por ejemplo, el procedimiento de dispersión debe llevarse a cabo en un tiempo muy corto hasta que la solidificación por enfriamiento comienza, de forma que es muy difícil obtener un alimento tipo gel que sea homogéneo en una escala másica.

Como un procedimiento para obtener alimentos reestructurados, además, se ha conocido un procedimiento para añadir un material de tipo pasta de transglutaminasa y colágeno disueltos en agua, a un material alimenticio sólido, para mezclarlos. Cuando la solidificación por enfriamiento del material de tipo pasta tiene lugar antes de que el material de tipo pasta se mezcle en el material alimenticio sólido, no puede obtenerse ningún producto con una fuerza de unión suficiente.

Además, el colágeno puede a veces mezclarse con agentes curados y líquidos de decapado, para utilizarlos en la producción de productos cárnicos procesados como jamón, tocino y cerdo rustido. Durante la preparación de dichos líquidos de decapado, la reacción transglutaminásica con el colágeno progresa, implicando, desventajosamente, un aumento en la viscosidad, hasta provocar, consecuentemente, que la inyección no pueda llevarse a cabo.

Por tanto, para obtener productos alimenticios que contengan transglutaminasa y colágeno, por tanto, la reacción de transglutaminasa deberá controlarse principalmente, y de forma importante, durante el proceso de producción.

Como uno de los procedimientos para suprimir la actividad enzimática de la transglutaminasa, es conocido un

procedimiento para disolver la transglutaminasa en agua a baja temperatura. El procedimiento utiliza el fenómeno de que la actividad de transglutaminasa, se suprime a temperatura baja. Sin embargo, no puede decirse que el proceso posea un efecto suficiente sobre el control de las propiedades físicas. Además, dicho control estricto de la temperatura durante el procedimiento de producción, no es práctico. Más aún, la solidificación por enfriamiento puede controlarse añadiendo, separadamente en el tiempo, transglutaminasa y colágeno. Sin embargo, dichos procedimientos son muy laboriosos durante el procedimiento de producción y no son preferibles.

A continuación, se describe la producción de sólo el alimento reestructurado. Además del procedimiento de adición de un material tipo pasta de transglutaminasa y colágeno disuelto en agua, a uno alimenticio sólido, existe un procedimiento que añade directamente polvo o transglutaminasa granular y colágeno a un material alimenticio sólido para que se unan.

Las preparaciones enzimáticas con transglutaminasa mezclada en la técnica relacionada, no son preparaciones con una amplia aplicabilidad para utilizarlas mediante cualquier de los dos procedimientos.

Por lo tanto, se desea una preparación adhesiva con una alta capacidad de aplicación que dé lugar a dichos efectos satisfactoriamente muy intensos mediante cualquier procedimiento, sin necesidad de utilizar una preparación específica para un procedimiento específico de producción. Además, la preparación enzimática para la unión, que comprende la transglutaminasa y el colágeno mezclados, tal como se da a conocer en JP-A-10-70961, puede producir una suficiente fuerza de unión. En los actuales lugares de producción, sin embargo, es necesaria, en un tiempo más corto, una preparación enzimática para la unión, que genere una fuerza más intensa de unión.

Exposición de la invención

Un objetivo de la invención consiste en proporcionar una preparación enzimática altamente procesable con transglutaminasa y colágeno mezclados, a partir de la cual pueden obtenerse productos comestibles de alta calidad (alimentos tipo gel, alimentos reestructurados, etc.) de forma no laboriosa, suprimiendo la solidificación por enfriamiento de soluciones de transglutaminasa y colágeno mezclados, y un procedimiento para producir productos alimenticios tales como alimentos tipo gel y reestructurados utilizando la preparación enzimática.

Se han realizado investigaciones de forma que se pudieran resolver los problemas. En consecuencia, se descubrió que ajustando el pH de una solución que contiene 1) transglutaminasa y 2) colágeno, a un intervalo de pH del orden de 3 o más a menos de pH 5, o a un intervalo de pH 10 o más a un pH 12 o menos, la solidificación por enfriamiento de la solución puede suprimirse, de forma que la solución pueda mantener las propiedades físicas apropiadas para el procedimiento de producción de los productos alimenticios durante un largo período de tiempo. Todavía adicionalmente, se descubrió que el efecto de la transglutaminasa no puede manifestarse hasta que un material con un efecto tampón pH, por ejemplo, carne comestible, se añade a y se mezcla con la solución que contiene 1) transglutaminasa y 2) colágeno, se ajusta al intervalo de pH específico, para neutralizar el pH de la solución a un intervalo de pH óptimo de la reacción para la transglutaminasa. Así, la invención se ha conseguido.

Es decir, la invención se refiere a lo que se describe a continuación:

1. Una preparación enzimática que comprende: 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que cambia el pH de la preparación enzimática, cuando se disuelve en una solución, a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad de la transglutaminasa es suprimida.
2. La preparación enzimática según el punto 1 anterior, en la que el intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime cuando la preparación enzimática se disuelve en la solución, es pH 3 o más a menos de pH 5 o pH 10 o más a pH 12.
3. La preparación enzimática según el punto 1 anterior, en la que la sustancia ácida o alcalina es una o más, seleccionada a partir de ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, carbonato sódico, carbonato potásico, fosfato trisódico, fosfato tripotásico, pirofosfato tetrasódico, pirofosfato tetrapotásico, sal sódica de glicina, sal potásica de glicina, hidróxido sódico, hidróxido potásico, y óxido cálcico (calcio calcinado).
4. La preparación enzimática según el punto 1 anterior, en la que el colágeno se deriva del pescado o marisco.
5. Una preparación enzimática que comprende: 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia alcalina que desplaza el pH de la preparación enzimática, cuando se disuelve en una solución, a un intervalo de pH 9 o más a pH 12 o menos, mezclándose directamente con un material alimenticio.
6. La preparación enzimática según el punto 5 anterior, en la que la sustancia alcalina o ácidas es una o más, seleccionada a partir de carbonato sódico, carbonato potásico, fosfato trisódico, fosfato tripotásico, pirofosfato tetrasódico, pirofosfato tetrapotásico, sal sódica de la glicina, sal potásica de la glicina, hidróxido sódico, hidróxido potásico e hidróxido cálcico y óxido cálcico (calcio calcinado).

7. La preparación enzimática según el punto 5 anterior, en la que el colágeno se deriva del pescado o marisco.
8. Procedimiento para obtener un producto alimenticio, que comprende una etapa de disolución de la preparación enzimática según el punto 1 anterior en una solución, una etapa de desplazamiento del pH de la solución resultante a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad de transglutaminasa se expresa, y una etapa subsiguiente de mezcla de la solución y un material alimenticio para retrodesplazar el pH de la mezcla resultante a un intervalo de pH en el que la actividad de transglutaminasa se exprese después de que una reacción de transglutaminasa se lleva a cabo.
9. El procedimiento para producir un producto alimenticio según el punto 8 anterior, en el que el intervalo de pH en el que la expresión de la transglutaminasa se suprime, es pH 3 o más a menos que pH 5, o pH 10 o más, a pH 12 o menos.
10. El procedimiento para producir un producto alimenticio según el punto 8 anterior, en el que el intervalo de pH en el que la actividad de transglutaminasa se expresa, es pH 5 o más a pH 8 o menos.
11. El procedimiento para producir un producto alimenticio según el punto 8 anterior, en el que el producto alimenticio es un alimento de tipo gel o un alimento reestructurado.
12. Procedimiento para producir un producto alimenticio, que comprende una etapa de mezclar directamente la preparación enzimática según el punto anterior 1 o 5, con materiales alimenticios, sin disolver la preparación enzimática en una solución, para llevar a cabo la reacción de transglutaminasa.
13. El procedimiento para producir un producto alimenticio según el punto 12 anterior, en el que el producto alimenticio es un producto reestructurado.
14. Procedimiento para producir un producto alimenticio, que comprende una etapa de disolución de la preparación enzimática según el punto 1 anterior, en una solución, una etapa de desplazamiento del pH de la solución resultante a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime, y una etapa subsiguiente de inyectar la solución resultante en un material alimenticio después de lo cual se lleva a cabo una reacción transglutaminásica.
15. El procedimiento para producir un producto alimenticio según el punto 14 anterior, en el que el intervalo de pH en el que la expresión de la actividad de transglutaminasa se suprime, es pH 3 o más, a menos que pH 5, o pH 10 o más a pH 12 o menos.
16. El procedimiento para producir un producto alimenticio según el punto 14 anterior, en el que el producto alimenticio es un producto muscular entero obtenido sin utilizar carne picada.
17. Procedimiento para producir un producto alimenticio, que comprende una etapa de disolución en una solución, de tres componentes: 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que desplaza el pH de la solución resultante a un intervalo de pH, en el que la expresión de la actividad de la transglutaminasa se suprime, y llevándose a cabo una etapa de mezclamiento de materiales alimenticios con la solución resultante para retrodesplazar el pH de la mezcla resultante a un intervalo de pH en el que la actividad de transglutaminasa se expresa después de que se lleve a cabo una reacción transglutaminásica.

La transglutaminasa es una enzima para catalizar la reacción de transferencia acilo entre el grupo γ -carboxamida del residuo glutamina en una cadena proteica o peptídica y amina primaria, para formar, por ejemplo, un enlace de reticulación ϵ -(γ -Glu)-Lys en el caso que la amina primaria sea el residuo de lisina de una proteína.

La transglutaminasa para la utilización según la invención se deriva de cualquier origen sin una limitación específica siempre que la transglutaminasa posea actividad de transglutaminasa e incluya transglutaminasa derivada de microorganismos (abreviada como MTGasa) de, por ejemplo, el género *Streptomyces* (por ejemplo, *Streptomyces mobaraensis* IFO 13819; *Streptoverticillium* se clasifica en el género *Streptomyces* mediante la dosificación habitual, que se clasificó en el género *Streptoverticillium*) (documento JP-A-64-27471, transglutaminasa derivada de mamíferos tales como cobayas (documento JP-A-58-14964), transglutaminasa derivada de peces tales como bacalao (Nippon Suisan Gakkaishi (Japanese Journal of Fisheries Science), Nobuo Seki *et al.*, Vol. 56, n° 1, pág. 125 (1990)), y transglutaminasa existente en la sangre (a la que también se hace referencia como Factor XIII), incluyendo además transglutaminasa obtenida mediante ingeniería genética (por ejemplo documentos JP-A-1-300889, JP-A-5-199883, JP-A-6-225775 y WO 93/15234).

Como transglutaminasa para utilizar según la invención puede utilizarse cualquier transglutaminasa descrita anteriormente. Sin embargo, se utiliza preferentemente la transglutaminasa derivada de microorganismos, porque la transglutaminasa puede producirse comercialmente a gran escala y resultar fácilmente disponible a bajo coste.

Además, alguna transglutaminasa requiere calcio para expresar su actividad (principalmente, la transglutaminasa

calcio-dependiente), y otras transglutaminasas nunca necesitan calcio para expresar su actividad (principalmente la transglutaminasa independiente del calcio). Cualquiera de estos tipos pueden utilizarse. En la presente memoria, se manipula más fácilmente la transglutaminasa independiente de calcio que nunca requiere calcio.

5 Según la invención, la actividad de la transglutaminasa se mide por el siguiente procedimiento del hidroxamato y su unidad se define también según el procedimiento del hidroxamato. Específicamente, la transglutaminasa se aplica a una solución reactiva de sustratos benciloxicarbonil-L-glutamilglicina e hidroxilamina en tampón Tris a una temperatura de 37°C y pH 6,0, para generar ácido hidroxámico, que es modificado en un complejo férrico en presencia de ácido tricloroacético. Entonces, se mide la absorbencia de la solución reaccionante a 525 nm, para
10 determinar el ácido hidroxámico generado, en una curva estándar. Entonces, la cantidad de la enzima que genera 1 μmol de ácido hidroxámico en un minuto, se define como una unidad (1 U) de la actividad transglutaminásica (documento JP-A-64-27471 y patente US n° 5.156.956).

15 Según la invención, puede utilizarse cualquier tipo de colágeno. El colágeno de cualquier material sin limitación específica, puede utilizarse según la invención. Generalmente, el colágeno se extrae de tejidos como huesos, piel, cartílago, escamas, y de la vejiga aérea de animales y pescados y del marisco. Particularmente, es conocido que el colágeno del pescado y del marisco se disuelve bien en agua. Así, el colágeno es muy útil para aplicaciones que requieren la preparación de la solución de colágeno a baja temperatura.

20 Para producir alimentos reestructurados, en particular, los procedimientos a baja temperatura son indispensables desde el punto de vista del control higiénico y del control del deterioro de la calidad. De acuerdo con esto, el colágeno derivado del pescado y marisco es apropiado para la producción de alimentos reestructurados, a causa de que el colágeno puede disolverse a baja temperatura. Se indica que dicho colágeno genera una fuerza más intensa de unión. Así, preferentemente, el colágeno derivado del pescado y marisco se utiliza para la preparación enzimática de la invención.
25

La composición de aminoácidos del colágeno es responsable de la solubilidad y de su temperatura de fusión. Se dice que la solubilidad y su temperatura de fusión dependen del contenido de prolina e hidroxiprolina. Por tanto, son representadas las composiciones aminoácidas de diversos tipos de colágeno (A a E) y su relación con la efectividad en la unión (ver tabla 1 y figura 1).
30

Tabla 1. Composiciones aminoácidas de varios colágenos (Relación de residuos aminoácidos en número)

	A	B	C	D	E
Hyp	9,5	9,8	9,6	5,3	5,8
Asp	4,8	4,6	4,6	5,1	5,3
Thr	1,7	1,8	1,8	2,4	2,4
Ser	3,6	3,3	3,3	6,3	5,0
Glu	7,3	7,2	7,3	7,2	7,5
Pro	12,2	11,9	12,6	10,4	11,1
Gly	34,2	33,5	33,8	36,0	36,0
Ala	10,4	11,1	11,3	11,1	10,9
Cys	0,0	0,0	0,0	0,2	0,3
Val	2,2	2,3	2,3	1,9	1,7
Met	0,5	0,4	0,4	0,9	1,0
Ile	1,1	1,2	1,1	1,1	1,1
Leu	2,5	2,7	2,5	2,1	1,9
Tyr	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0
Phe	1,4	1,5	1,6	1,5	1,4
Lys	2,9	2,8	2,7	2,7	2,5
His	0,6	0,5	0,4	0,9	1,0
Arg	4,8	5,1	4,8	5,2	5,2
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Hyp+Pro (%)	21,7	21,7	22,2	15,7	16,9

35 Consecuentemente, se encontró que la fuerza de unión resultante del colágeno con el número total de residuos de prolina e hidroxiprolina al 0,1% o más, a menos del 20% del número total de residuos aminoácidos, fue tan grande particularmente, que dicho colágeno fue apropiado para utilizarlo en los alimentos reestructurados (documento PCT/JP02/02840). El colágeno con dicha composición aminoácida se deriva del pescado y marisco.

40 Según la invención, el término colágeno significa colágeno extraído y purificado de tejidos de animales y pescados y marisco. La extracción y el procedimiento de descomposición o el grado de modificación del colágeno resultante no están limitados específicamente. Durante el procedimiento de extracción, el colágeno se hidroliza en varios grados, y por lo tanto, la distribución ponderal molecular del colágeno resultante es, frecuentemente, muy amplia. Según la invención, el término colágeno incluye la así denominada gelatina en sentido estricto, que es una modificación del

colágeno.

Además, el colágeno no constituye necesariamente un producto purificado y puede contener parcialmente grasas, hidratos de carbono, péptidos, aminoácidos y similares, a menos que estos inhiban la intención ventajosa de la invención. Además, el colágeno, según la invención incluye no sólo colágeno de un único origen, sino también colágeno (que incluye gelatina) de orígenes varios mezclados en una proporción apropiada.

Muy característicamente, la preparación enzimática de la invención, contiene 3) una sustancia ácida o alcalina que cambia el pH de la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica es suprimida, además 1) transglutaminasa, 2) colágeno.

Cuando la preparación enzimática se disuelve en una solución (la solución es generalmente una solución acuosa, pero incluye también por ejemplo, materiales líquidos), más específicamente, la sustancia ácida o alcalina ajusta el pH de la solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime, principalmente un intervalo de pH 3 o más a menos que 5 o un intervalo de pH 10 o más a pH 12 o menos.

A causa de que la transglutaminasa expresa dificultosamente su actividad en el intervalo de pH anteriormente descrito, la solidificación por enfriamiento de la solución es suprimida. Por tanto, la capacidad del procesamiento para producir productos alimenticios, tales como alimentos de tipo gel y reestructurados, puede mejorarse de forma distinta.

Como sustancia ácida o alcalina, puede utilizarse cualquier sustancia ácida o alcalina capaz de ajustar la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH 3 a menos que 5 o a un intervalo de pH 10 o más, a pH 12 o inferior. Generalmente, las preparaciones enzimáticas se disuelven en agua para utilizarlas en forma de una solución de aproximadamente 10 a 25%. Por tanto, una sustancia ácida o alcalina capaz de ajustar una solución acuosa de 10 a 25% de la preparación enzimática, a un intervalo de pH 3 o más a menos que 5, o a un intervalo de pH 10 o más a pH 12 o menos, puede seleccionarse satisfactoriamente. Adicionalmente, pueden utilizarse combinadas dos o más de dichas sustancias ácidas o alcalinas.

La sustancia alcalina (que cambia el pH a una región alcalina) incluye sales de sodio, potasio, calcio o magnesio de ácidos inorgánicos, tales como ácido fosfórico y carbónico. Específicamente, la sustancia alcalina incluye carbonato sódico, carbonato potásico, fosfato trisódico, polifosfato sódico, pirofosfato tetrasódico, fosfato tripotásico, pirofosfato tetrasódico, pirofosfato tetrapotásico, sal sódica de glicina, sal potásica de glicina, hidróxido sódico, hidróxido potásico, y óxido cálcico (también se refiere a calcio calcinado).

Adicionalmente, la sustancia ácida (que desplaza el pH a una región ácida), incluye ácido cítrico, ácido adípico, ácido glucónico, ácido acético, ácido láctico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico y ácido sulfúrico.

Sin embargo, estos ejemplos no son limitativos. Siempre que el objetivo de la invención pueda alcanzarse, pueden ser satisfactorias cualesquiera sustancias que ajusten el pH. Entre estas sustancias ácidas o básicas particularmente preferibles se incluyen ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, carbonato sódico, carbonato potásico, fosfato trisódico, fosfato tripotásico, pirofosfato tetrasódico, pirofosfato, tetrapotásico, sal sódica de glicina, sal potásica de glicina, hidróxido sódico, hidróxido potásico, y óxido cálcico (también se refiere a calcio calcinado).

Las cantidades de los elementos esenciales para la preparación enzimática de la invención, principalmente 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) dicha sustancia ácida o alcalina, que van a mezclarse, no están específicamente limitadas, pero generalmente, por 1 g de la preparación enzimática, la transglutaminasa es de 1 U a 200 U, preferentemente de 10 U a 150 U; y el colágeno es de 0,1 g a 0,9 g, preferentemente de 0,2 g a 0,6 g. Adicionalmente, cuando una sustancia ácida o alcalina se mezcla con una cantidad para ajustar el pH inicial de la preparación enzimática a un intervalo en el que la expresión de la actividad de la transglutaminasa se suprime, no existe ninguna limitación particular con un intervalo, principalmente, de pH 3 o más a menos que 5, o un intervalo de pH 10 o más a pH 12 o menos.

Para la preparación enzimática de la invención, adicionalmente, los elementos 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) dicha sustancia ácida o alcalina, no se mezclan necesariamente en un contenedor, pero pueden situarse en un conjunto de contenedores separados, que está en forma de lo que se denomina "conjunto". Según la invención, pueden mezclarse varios ingredientes apropiados, distintos a los elementos 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) la sustancia ácida o alcalina, que desplazan el pH de la preparación enzimática cuando se disuelven en una solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminasa, se suprime.

La preparación enzimática puede contener, por ejemplo, los siguientes agentes de asociación que se conocen por su utilización en los productos alimenticios: sacáridos tales como lactosa, sacarosa, maltosa, maltitol, sorbitol y trehalosa, dextrina, dextrina ramificada, ciclodextrina, engrosantes tales como almidones, polisacáridos, gomas, pectina, agar, carrageenina, y ácido alginico; y similares.

Adicionalmente, la preparación enzimática puede contener caseínas, varias proteínas animales y proteínas

vegetales como proteína de soja y proteína de trigo.

Adicionalmente, todavía, la preparación enzimática puede mezclarse apropiadamente con condimentos, azúcar purificado, especias, colorantes, agentes que propicien el color, ácidos orgánicos tales como ácido ascórbico y sus sales, emulsificantes, aceites y grasas, micropartículas de dióxido de silicón y similares.

Para la utilización como líquido de decapado, además, los ingredientes anteriormente mencionados, pueden no mezclarse necesariamente en la preparación enzimática, pero pueden añadirse a un líquido de decapado de forma separada de la preparación enzimática de la invención.

El procedimiento para producir productos alimenticios tales como alimentos de tipo gel y reestructurados, que utiliza la preparación enzimática de la invención, se describe a continuación. La característica más significativa de la invención es el control de la viscosidad de una solución que contiene transglutaminasa y colágeno, ajustando el pH de la solución a un intervalo de pH 3 o más, a menos que pH 5, o de un intervalo de pH 10 o más a pH 12 o menos.

Esto puede describirse sobre la base de la dependencia del pH y de la estabilidad de la actividad transglutaminásica. La figura 2 muestra, en el gráfico que expresa la dependencia del pH, que el pH óptimo de la transglutaminasa es el pH 5 al pH 8, y que la expresión de la actividad de transglutaminasa se reduce por fuera del intervalo de pH, indicando aparentemente un progreso extremadamente pobre de la reacción de transglutaminasa. Sin embargo, se centró asimismo la atención en el hallazgo que se muestra en el gráfico de la estabilidad del pH en la figura 2, en el que la estabilidad de la transglutaminasa se conservó bastante bien en un intervalo externo al intervalo de pH óptimo, particularmente en la región alcalina. En otras palabras, cuando el pH de la solución se desplaza a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime mucho y se retrodesplaza entonces a la región de pH óptimo de la actividad de transglutaminasa, después de llevar a cabo una operación tal como la dispersión al material alimenticio, tiene lugar una reacción de transglutaminasa. De tal forma, los problemas de la técnica relacionada pueden superarse, y por lo tanto, pueden obtenerse las ventajas satisfactorias.

Cualquier procedimiento de cambio de pH puede ser satisfactorio, sin limitación, siempre que el procedimiento permita el cambio a un intervalo de pH donde pueda obtenerse actividad de transglutaminasa. El procedimiento de desplazamiento de pH incluye, por ejemplo, una etapa de mezclado de la solución con un material alimenticio con un efecto tampón del pH. La carne comestible como ternera, cerdo, carne de ave, carne de pollo y de pescado, así como también los fluidos que se denominan generalmente jugos tales como líquidos, sangre, líquidos tisulares, etc. de los animales, tienen efectos tampón de pH muy importantes.

Disolviendo la preparación enzimática en una solución y mezclando la solución sometida a la supresión de la solidificación por enfriamiento, con materiales alimenticios, el pH puede entonces cambiarse al óptimo intervalo de pH (pH 5 o más, a pH 8 o menos), para progresar en la reacción enzimática. De tal forma, los productos alimenticios deseados, por ejemplo alimentos de tipo gel y alimentos reestructurados, pueden producirse.

Tal como se ha descrito anteriormente, la solidificación por enfriamiento de la solución puede suprimirse en el intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime. Cuando la carne de cerdo y similares se añaden a y se mezclan con la solución, el efecto de tampón pH de la carne de cerdo y similares pueden ajustar la mezcla resultante a pH entre 5 y pH 8. Inyectando un líquido de decapación que contiene la preparación enzimática de la invención, en materiales alimenticios para jamones, tocinos y cerdo rustido, pueden procurarse además idéntico efecto, involucrando la recuperación de productos de músculos enteros producidos sin utilizar carne picada (jamón, tocino, cerdo rustido, etc.) de alta calidad.

Cuando un material alimenticio no tiene tal efecto tampón de pH distinto a la carne de bovino o vacuno, la adición de una sustancia ácida o alcalina o, de un material alimenticio tratado con ácidos o álcalis, puede neutralizar la solución. Añadiendo dicho material alimenticio a la solución, por ejemplo, puede producirse de forma razonable un alimento tipo gel dispersando en ella materiales frescos o secos. Sólo si la solución puede neutralizarse tal como se ha descrito anteriormente, puede añadirse cualquier material alimenticio sin limitación específica de su forma o tamaño, o de si está en forma líquida o sólida.

Como material alimenticio, según la invención, puede utilizarse no sólo la carne denominada comestible como ternera, cerdo, carne de caballo, de carnero, de cabra, de aves de corral y de pollo, sino también varios pescados, mariscos, especies de crustáceos tales como camarones, cangrejos, especies de moluscos tales como calamares y pulpos y huevos de pescado tales como piezas de salmón y piezas de salmón en forma de filete, de forma separada. No es necesario decir qué materiales alimentarios distintos a los descritos anteriormente, pueden utilizarse también, o dos o más de dichos materiales alimenticios pueden utilizarse satisfactoriamente en combinación.

A causa de que el efecto sobre la supresión de la reacción de transglutaminasa y el efecto sobre la aceleración de la reacción mediante el ajuste del pH, dependen de la temperatura, la cantidad de transglutaminasa, el tipo y cantidad de una proteína sustrato, el tiempo de reacción y similares, el efecto resultante depende de cada una de las condiciones de la producción. Dependiendo de cuál es el tipo de producto final que se desea, se determinarán varias condiciones anteriormente descritas.

Uno de los productos alimenticios para los que la invención resulta más eficaz, es el alimento reestructurado. En otras palabras, el alimento se produce uniendo piezas de carne. La producción del producto reestructurado se describe a continuación con mayor detalle.

5 El procedimiento de producción del alimento reestructurado se divide en dos grupos: uno es un proceso (procedimiento de disolución en el agua) de disolución de una preparación enzimática para adhesión en una solución (agua o materiales líquidos o similares), añadiendo la mezcla resultante de tipo pasta a materiales sólidos, para moldeo y adhesión; y el otro es un proceso (procedimiento de rociado en polvo) o de adición directa de una preparación enzimática para unir a materiales alimenticios sólidos, sin disolución de la preparación enzimática en ninguna solución (agua o materiales líquidos o similares).

15 En primer lugar se describe el procedimiento de disolución acuosa utilizando la preparación enzimática de la invención. En la primera etapa, disolviendo en agua o similares la preparación enzimática que contiene 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que desplaza el pH de la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad de transglutaminasa se suprime, ajustándose la solución resultante a un intervalo de pH 3 o más a menos que pH 5, o un intervalo de pH 10 o más, a pH 12 o menos. En el intervalo de pH, la expresión de la actividad de transglutaminasa se suprime, y no se lleva a cabo la solidificación por enfriamiento.

20 Entonces, los materiales alimenticios tales como ternera, se mezclan con la solución (materiales líquidos). A causa de que tales materiales alimenticios tienen un efecto tampón de pH, el pH de la mezcla resultante se desplaza a un intervalo de pH en el que la actividad de transglutaminasa se expresa, principalmente en un intervalo de pH 5 o más, a pH 8 o menos, mediante su adición y mezcla. Cuando el pH no alcanza nunca el intervalo de pH 5 o más al pH 8 o menos, incluso después de la adición y mezcla de los materiales alimenticios, se añade un reactivo para el ajuste del pH, para desplazar el pH de la mezcla a un intervalo óptimo de pH para la reacción de transglutaminasa, principalmente a un intervalo de pH 5 o más, al pH 8 o menos.

30 Generalmente, la reacción de transglutaminasa puede realizarse de forma satisfactoria entre 0° y 55°C durante 10 segundos a 24 horas. Naturalmente, la condición reactiva no es limitante. Tal como se ha descrito anteriormente, empieza la reacción de transglutaminasa, de forma que puede obtenerse un producto alimenticio reestructurado.

35 Para dicha producción, la preparación enzimática de la invención se utiliza lo más apropiadamente. Sin embargo 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) la sustancia ácida o alcalina que desplaza el pH de la preparación enzimática a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad de transglutaminasa se suprime, pueden adquirirse satisfactoriamente y utilizarse separadamente. En este caso, la transglutaminasa, el colágeno y la sustancia ácida o alcalina se mezclan conjuntamente pues permanecen en forma de polvo; y entonces, la mezcla resultante se disuelve en una solución tal como agua, satisfactoriamente. De otro modo, las sustancias individuales se disuelven primero en agua y similares, y entonces, las soluciones resultantes se mezclan juntas, de modo satisfactorio. 40 Disolviendo el colágeno en agua y similares, adicionalmente, una sustancia ácida o alcalina se utiliza satisfactoriamente para ajustar el pH de la solución resultante, a la que se añade la transglutaminasa.

45 De forma muy importante, el pH de la solución se desplaza al intervalo de pH (un intervalo de pH 3 o más a menos que pH 5, o un intervalo de pH 10 o más a pH 12 o menos), donde la actividad transglutaminásica se suprime.

50 Los procedimientos siguientes son idénticos a aquellos en el caso de que se emplee la preparación enzimática. Específicamente, la solución y los materiales alimenticios se mezclan conjuntamente, para ajustar la mezcla resultante al intervalo de pH donde se expresa la actividad de transglutaminasa, principalmente el intervalo de pH 5 o más al pH 8 o menos, para que la reacción de transglutaminasa progrese para obtener los alimentos reestructurados.

55 Los procedimientos de rociado pulverulento que utilizan la preparación enzimática de la invención, se describen a continuación. Los procedimientos de rociado pulverulento presentan una característica distinta de los procedimientos de solución acuosa porque la preparación enzimática sin disolución se rocía directamente sobre los materiales alimenticios, a los que la preparación enzimática por sí misma tiene la intención de adherirse. Cuando la preparación enzimática se añade directamente a materiales alimenticios tal como se ha descrito anteriormente, el pH de las superficies que se adhieren una a otra cambia al intervalo de pH apropiado para la reacción de transglutaminasa mediante sus efectos de tampón pH. Así, se forma un gel más fuerte, para alcanzar una fuerza más potente de unión.

60 Como preparación enzimática, puede utilizarse una preparación enzimática que contiene 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia alcalina que desplaza la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH 9 o más, a pH 12 o menos, añadiéndola a esta preparación enzimática para su utilización en los procedimientos de solución acuosa. Sin embargo, la preparación enzimática puede utilizarse sólo para los procedimientos de rociado pulverulento incluyendo una etapa de adición directa de la preparación enzimática a los materiales alimenticios. La sustancia alcalina incluye, por ejemplo, carbonato sódico, carbonato potásico, fosfato 65

trisódico, fosfato tripotásico, pirofosfato tetrasódico, pirofosfato tetrapotásico, sal sódica de glicina, sal potásica de glicina, hidróxido sódico, hidróxido potásico y óxido cálcico (calcio calcinado).

5 Después de que estas preparaciones enzimáticas se mezclen con materiales alimenticios en bruto, debe llevarse a cabo la reacción de transglutaminasa. Las condiciones para la reacción transglutaminásica no están así limitadas, pero incluyen generalmente de 0° a 55°C durante 10 segundos a 24 horas, de forma satisfactoria. De tal forma, puede obtenerse el alimento reestructurado.

10 Según la invención, además, la preparación enzimática que contiene 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que desplaza el pH de la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime, se puede utilizar tanto para los procedimientos de disolución acuosa como para los de rociado pulverulento. De este modo, la preparación enzimática posee una amplia aplicabilidad. Adicionalmente, la preparación enzimática genera una fuerza de unión muy intensa.

15 La preparación enzimática se utiliza preferentemente de una forma única para producir el alimento reestructurado mediante los procedimientos de rociado pulverulento. Sin embargo, 1) transglutaminasa, 2) colágeno, y 3) una sustancia ácida o alcalina que cambia el pH de la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica es suprimida, puede ser adquirida satisfactoriamente de modo separado, para producir alimentos reestructurados mediante los procedimientos de rociado pulverulento.

20 Alternativamente, 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia alcalina que cambia el pH de la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH de pH 9 o más a pH 12 o menos, puede ser también separadamente adquirida de forma satisfactoria, para producir alimento reestructurado mediante el procedimiento de rociado pulverulento.

25 Según la invención, la preparación enzimática que contiene 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que cambia el pH de la preparación enzimática cuando se disuelve en una solución a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica es suprimida, se utiliza para producir alimentos reestructurados tal como se ha descrito anteriormente. Adicionalmente, la preparación enzimática puede utilizarse para producir alimentos de tipo gel distintos que los reestructurados. Los alimentos tipo gel incluyen por ejemplo gelatinoso (que incluyen gelatinas muy estables térmicamente y gelatinas que contienen piezas de material tales como piezas vegetales y piezas de fruta); gelatinas azucaradas en gránulos; golosinas gomosas; y productos alimenticios como aletas de tiburón. Adicionalmente, la preparación enzimática puede utilizarse para producir líquidos de decapado y productos musculares enteros sin utilizar carne picada (jamón, tocino, cerdo rustido, etc.), preparados utilizando líquidos de decapado.

30 Para la producción de cualquiera de los alimentos reestructurados, alimentos tipo gel, y productos musculares enteros sin utilizar carne picada preparados utilizando líquidos de decapación, generalmente, se utiliza la transglutaminasa en una cantidad de 0,001 U a 100 U, preferentemente de 0,01 U a 10 U, utilizándose el colágeno en una cantidad de 0,0001 g a 0,9 g, preferentemente de 0,001 g a 0,5 g por 1 g de un producto final según la invención. Incluso en el caso de utilizar transglutaminasa y colágeno en combinación en forma de una preparación enzimática o separadamente, la transglutaminasa y el colágeno se utilizan satisfactoriamente en los intervalos cuantitativos.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 muestra la fuerza de unión que resulta de la utilización de varios tipos de colágeno.

La figura 2 muestra la dependencia del pH y la estabilidad de la actividad transglutaminásica.

Mejor modo de poner en práctica la invención

40 La invención se describe a continuación con mayor detalle en los ejemplos siguientes. Obviamente el alcance técnico de la invención no se limita a estos ejemplos.

Ejemplo 1: Medición del tiempo de solidificación por enfriamiento utilizando colágeno de pescado.

45 Una transglutaminasa comercialmente disponible ("Activa" TG, con una actividad específica de producto de 1.000 U/g, preparada por Ajinomoto Co., Inc.), derivada del género *Streptomyces* (*Streptomyces mobaraensis* IFO 13819) se utilizó como transglutaminasa. Adicionalmente el colágeno de pescado "HMW Fish Gelatin" (bajo denominación comercial), preparado por Kenny & Ross Ltd., se utilizó como colágeno de pescado, "APH-250" (bajo denominación comercial) preparado por Nitta Gelatin Co., se utilizó como colágeno animal.

50 Se añadió agua (24 g) al colágeno del pescado "HMW Fish Gelatin" preparado por Kenny & Ross Ltd. (3,2 g; bajo

nombre comercial; éste incluye el término Gelatin pero en la presente memoria, se hace referencia al producto como colágeno de pescado), para disolver el colágeno a temperatura ambiente. La solución resultante se ajustó a los pH individuales que se muestran a continuación en la tabla 2 con una solución acuosa al 27% de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico concentrado. A las soluciones resultantes con el ajuste de pH se les añadió transglutaminasa (0,48 g) disuelta en 8 g de agua, durante 10 segundos con agitación para medir los pH de las mezclas. Con un reómetro fabricado por Haake GmbH & Co., entonces, el módulo de almacenamiento y el módulo de pérdida se midieron a intervalos después de la adición de transglutaminasa, para determinar el tiempo de solidificación por enfriamiento cuando el módulo de almacenamiento coincidía con el módulo de pérdida. Como control, se añadió la transglutaminasa a una solución acuosa del colágeno de pescado (HMW Fish Gelatin) sin ajuste de pH, para la determinación del tiempo de solidificación por enfriamiento de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2, dependencia del pH del tiempo de solidificación por enfriamiento con colágeno de pescado y transglutaminasa.

PH de mezclas de colágeno de pescado y transglutaminasa	Tiempo de solidificación por enfriamiento (minutos)
2,5	> 60
3	> 60
4	30
6	< 1
7	< 1
8	1
9	3
9,5	4
10	10
11	> 60
12	> 60
Control (pH 5)	3

Tal como se muestra en la Tabla 2, la solución acuosa del colágeno de pescado podría retrasar la solidificación por enfriamiento mediante la reacción transglutaminásica, cuando la solución acuosa del colágeno de pescado se ajustó a un intervalo de menos de pH 5 o a un intervalo de pH 10 o más.

Ejemplo 2. Tiempo de medición de la solidificación por enfriamiento utilizando colágeno animal.

Se añadió agua (24 g) al colágeno animal (“APH-250” preparado por Nitta Gelatin Co.; 3,2 g), para disolver el colágeno en un baño acuoso a 40°C. La solución resultante se ajustó al pH individual que se muestra en la Tabla 3 con una solución acuosa de hidróxido sódico al 27%, o con ácido clorhídrico concentrado. A las soluciones resultantes con pH ajustado se les añadió la misma transglutaminasa (0,48 g; “Activa” TG con una actividad específica de 1.000 U/g producto, preparada por Ajinomoto Co., INC.), tal como se utilizó en el Ejemplo 1, después de la disolución en 8 g de agua durante 10 segundos con agitación para medir los pH de las mezclas. Con un reómetro fabricado por Haake GmbH & Co., el módulo de almacenamiento y el de pérdida se midieron entonces a 40°C a intervalos, después de la adición de transglutaminasa, para determinar el tiempo de disolución por enfriamiento cuando el módulo de almacenamiento coincidió con el módulo de pérdida. Como control, se añadió la transglutaminasa a una solución acuosa del colágeno animal (APH-250) sin ajuste de pH, para la determinación del tiempo de disolución por enfriamiento de la misma forma que se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Dependencia del pH del tiempo de disolución por enfriamiento con colágeno animal y transglutaminasa.

PH de mezclas de colágeno de animal y transglutaminasa	Tiempo de disolución por enfriamiento (minutos)
2,5	> 60
3	> 60
4	6
6	1
7	1
8	2
9	2,5
10	5
11	37
12	> 60
Control (pH 5)	3,5

Tal como se muestra en la Tabla 3, la solución acuosa del colágeno animal podría retrasar la disolución por enfriamiento mediante la reacción de transglutaminasa, como la solución acuosa del colágeno de pescado, cuando

la solución acuosa del colágeno animal se ajustó a un intervalo de menos del pH 5, o a un intervalo de pH 10 o más. A pH 4 y pH 10, sin embargo, el colágeno del pescado podría retrasar durante más tiempo la disolución por enfriamiento.

5 Ejemplo 3: Producción de cerdo reestructurado con transglutaminasa y colágeno de pescado (mediante el procedimiento de solución acuosa).

10 Se disolvieron 6 g del colágeno de pescado utilizado en el Ejemplo 1, en 50 g de agua, para llevar a cabo el ajuste del pH con una solución acuosa al 27% de hidróxido sódico o de ácido clorhídrico concentrado al pH individual que se muestra a continuación en la Tabla 4. A las soluciones del colágeno se les añadieron 0,9 g de la misma transglutaminasa ("Activa" TG con una actividad específica de 1.000 U/g producto, preparado por Ajinomoto Co., Inc.), tal como se utiliza en el Ejemplo 1 disuelta en 10 g de agua, durante 10 segundos con agitación para la medición del pH, seguido por la conservación de las soluciones resultantes durante 10 minutos para confirmar la presencia o ausencia de la disolución por enfriamiento.

15 Cuando la solución de mezcla no se solidifica incluso 10 minutos después, un total de 300 g de piezas de muslo de cerdo (alrededor de un cubo de 2 cm) se añadieron y se mezclaron suficientemente con 13,4 g de la solución de la mezcla, de forma que la mezcla de colágeno y transglutaminasa pudiera mezclarse totalmente con las piezas de carne. La actividad de transglutaminasa utilizada entonces fue de 0,6 U por un gramo del producto final, mientras que el colágeno de pescado se utilizó en una cantidad de 0,004 g por un gramo del producto final.

20 Rellenando la mezcla resultante en un tubo provisto de una carcasa con una anchura de plegado de 75 mm, el tubo con carcasa se mantuvo a 5°C durante 2 horas, para llevar a cabo la reacción de transglutaminasa. Después de la reacción, el tubo con carcasa se situó en un congelador a -40°C, y se guardó bajo congelación hasta que se realizó una evaluación. Como control, se utilizó una solución acuosa del colágeno de pescado sin ajuste del pH. Inmediatamente después de la adición de la transglutaminasa a la solución acuosa del colágeno del pescado, se preparó mediante idénticos procedimientos el cerdo reestructurado.

25 El cerdo reestructurado bajo congelación se cortó en lonchas de 9 mm de grosor y de 2,5 cm de anchura: después de descongelación, la fuerza de unión se midió con un analizador de textura fabricado por Stable Micro Systems, Co. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Dependencia del pH de la fuerza de unión con transglutaminasa y colágeno de pescado

PH de mezclas de pescado colágeno y transglutaminasa	Fuerza de adhesión (g/cm ²)
2,5	19
3	150
4	157
6	-(gelificada)
7	-(gelificada)
8	-(gelificada)
9	-(gelificada)
10	169
11	115
12	105
12,5	0
Control (pH 5)	89

35 En el caso de que en la solución acuosa de colágeno no se hubiera efectuado ajuste de pH, específicamente la mezcla se solidificó mediante la reacción de transglutaminasa, antes de que se añadiera la mezcla a las piezas de cerdo, de forma que la mezcla no pudo utilizarse para la producción de ningún alimento reestructurado.

40 Mediante el ajuste de pH de la solución acuosa de colágeno, a un intervalo de pH 3 a pH 4, o a un intervalo de pH 10 a pH 12, la mezcla resultante podría conservar las propiedades físicas apropiadas para realizar la mezcla con las piezas de cerdo durante un tiempo suficiente para que los procedimientos de mezclado fueran suficientes y que también se pudiera alcanzar suficiente fuerza de unión en el producto final.

45 Adicionalmente, se midió el pH después de la mezcla con las piezas de cerdo. El pH de la superficie de la carne en cualquiera de los lotes experimentales, cambió de pH 5 a pH 7. En todos los lotes experimentales con las piezas de carne mezcladas, el pH cambió al intervalo de pH en el que la reacción transglutaminásica se expresa a través de la mezcla con las piezas de carne. En los lotes experimentales con las soluciones acuosas de colágeno a pH 2,5 y pH 12,5, la transglutaminasa se inactivó antes de la mezcla con las piezas de carne, de forma que la fuerza de unión mediante la reacción de transglutaminasa, fue escasa o nula.

Ejemplo 4: Producción de ternera reestructurada con transglutaminasa y colágeno de pescado (procedimientos de rociado pulverulento).

Según la tabla 5 a continuación que muestra composiciones, se prepararon seis tipos de preparaciones enzimáticas. Las preparaciones enzimáticas se depositaron en la superficie de piezas de carne de muslo de ternera (cubos de aproximadamente 2 cm); dos de dichas piezas de carne se adhirieron próximas a las superficies, depositándose una de las preparaciones enzimáticas, seguido por el sellado al vacío. La cantidad de la transglutaminasa que se utilizó entonces fue de 0,64 U por un gramo del producto final, mientras que el colágeno de pescado se utilizó en una cantidad de 0,003 g por un gramo del producto final.

Como control, se utilizó una preparación enzimática sin mezcla de carbonato sódico (preparación enzimática 1 en la Tabla 5 a continuación).

El colágeno de pescado que se utilizó en el ejemplo 1 y la transglutaminasa que se utilizó en el ejemplo 1 ("Activa" TG con una actividad específica de 1.000 U/g, producto preparado por Ajinomoto Co., Inc.), se utilizaron como el colágeno y la transglutaminasa respectivamente.

Después de conservar las piezas de ternera resultantes a 5°C durante 2 horas para llevar a cabo la reacción de transglutaminasa, se midió la fuerza de unión de las dos piezas de carne con un analizador de textura fabricado por Stable Micro Systems, Co., Ltd. en un ensayo de tensión (Tabla 6). Aquí, la Tabla 6 muestra los pH de las superficies cárnicas con estas preparaciones enzimáticas, junto con los pH de las soluciones acuosas al 20% de las preparaciones enzimáticas individuales.

Tabla 5. Composiciones de preparaciones enzimáticas

Materiales	Proporción de composición (% en peso)					
	1 (control)	2	3	4	5	6
Transglutaminasa	6	6	6	6	6	6
Colágeno del pescado	30	30	30	30	30	30
Lactosa	64	63	62	61	59	54
Carbonato sódico	0	1	2	3	5	10
Total		100				

Tabla 6. Relación de la fuerza de unión de la ternera reestructurada utilizando varias preparaciones enzimáticas con los pH (de las soluciones acuosas de las preparaciones enzimáticas y de las superficies cárnicas reestructuradas).

	1 (control)	2	3	4	5	6
Fuerza de unión (g/cm ²)	241	280	320	428	395	329
pH de la solución acuosa al 20% de la preparación enzimática	5,3	9,5	9,9	10,2	10,5	10,8
pH de la superficie cárnica con enzima preparación depositada	5,5	5,9	6,2	6,7	7,1	7,8

Las preparaciones enzimáticas en los lotes experimentales 2 a 6 cuando se disuelven en agua mostraban un pH de 9 o más, o a más pH 12 o menos. Cuando se depositaron en las piezas cárnicas, las superficies de las piezas de carne cambiaron a un intervalo de pH de 5 o más a pH 8 o menos, principalmente el intervalo de pH en el que la reacción transglutaminásica se llevó a cabo mediante su efecto tampón de pH. A causa de que los niveles de la fuerza de unión en cualquiera de los lotes experimentales eran superiores a los del lote 1 de control, las preparaciones enzimáticas que contenían la sustancia alcalina, potenciaron la fuerza de unión en un grado más alto que la preparación enzimática que no contenía a dicha sustancia alcalina.

Aplicabilidad industrial

Según la invención, la disolución por enfriamiento inmediato de una solución de transglutaminasa y colágeno mezcladas, puede suprimirse, para mejorar la capacidad de procesamiento de la producción de los productos alimenticios tales como los alimentos reestructurados. Utilizando la preparación enzimática de la invención adicionalmente, los materiales alimenticios pueden adherirse conjuntamente de forma intensa. Una forma de realización de la preparación enzimática según la invención puede utilizarse para tanto realizar el procedimiento de disolver la preparación enzimática en agua, como el de utilizar un material líquido para preparar uno de tipo pasta para utilizarlo como aglomerante (procedimientos de solución acuosa), y también el procedimiento de rociar directamente la preparación enzimática sobre un material alimenticio sólido para llevar a cabo la unión (procedimientos de rociado pulverulento). Por tanto, dicha preparación enzimática es muy útil como una preparación enzimática con una amplia aplicabilidad.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Preparación enzimática que comprende 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que desplaza el pH de la preparación enzimática, cuando se disuelve en una solución, a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad de la transglutaminasa es suprimida.
- 10 2. Preparación enzimática según la reivindicación 1, en la que el intervalo de pH en el que la expresión de la actividad de la transglutaminasa se suprime cuando la preparación enzimática se disuelve en la solución, es pH 3 o más a menos de pH 5 o pH 10 o más a pH 12.
- 15 3. Preparación enzimática según la reivindicación 1, en la que la sustancia ácida o alcalina es una o más seleccionadas de entre ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, carbonato sódico, carbonato potásico, fosfato trisódico, fosfato tripotásico, pirofosfato tetrasódico, pirofosfato tetrapotásico, sal sódica de glicina, sal potásica de glicina, hidróxido sódico, hidróxido potásico, y óxido cálcico.
- 20 4. Preparación enzimática según la reivindicación 1, en la que el colágeno se deriva del pescado o del marisco.
- 25 5. Preparación enzimática que comprende 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia alcalina que desplaza el pH de la preparación enzimática, cuando se disuelve en una solución, a un intervalo de pH 9 o más a pH 12 o menos, mezclándose directamente con un material alimentario.
- 30 6. Preparación enzimática según la reivindicación 5, en la que la sustancia alcalina o ácidas es una o más seleccionadas de entre carbonato sódico, carbonato potásico, fosfato trisódico, fosfato tripotásico, pirofosfato tetrasódico, pirofosfato tetrapotásico, sal sódica de glicina, sal potásica de glicina, hidróxido sódico, hidróxido potásico e hidróxido cálcico y óxido cálcico.
- 35 7. Preparación enzimática según la reivindicación 5, en que el colágeno se deriva del pescado o marisco.
- 40 8. Procedimiento para producir un producto alimenticio, que comprende una etapa de disolución de la preparación enzimática según la reivindicación 1 en una solución, una etapa de desplazamiento del pH de la solución resultante a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime, y una etapa subsiguiente de mezcla de la solución y un material alimenticio para retrodesplazar el pH de la mezcla resultante a un intervalo de pH en el que la actividad de la transglutaminasa se expresa realizándose a continuación cual una reacción transglutaminásica.
- 45 9. Procedimiento para producir un producto alimenticio según la reivindicación 8, en el que el intervalo de pH en el que la expresión de la transglutaminasa se suprime es pH 3 o más a menos que pH 5 o pH 10 o más a pH 12 o menos.
- 50 10. Procedimiento para producir un producto alimenticio según la reivindicación 8, en el que el intervalo de pH en el que la actividad de la transglutaminasa se expresa es pH 5 o más a pH 8 o menos.
- 55 11. Procedimiento para producir un producto alimenticio según la reivindicación 8, en el que el producto alimenticio es un alimento de tipo gel o un alimento reestructurado.
- 60 12. Procedimiento para producir un producto alimenticio, que comprende una etapa de mezclar directamente la preparación enzimática según la reivindicación 1 o 5, a los materiales alimenticios, sin disolver la preparación enzimática en una solución, para llevar a cabo la reacción de transglutaminasa.
- 65 13. Procedimiento para producir un producto alimenticio según la reivindicación 12, en el que el producto alimenticio es un producto reestructurado.
14. Procedimiento para producir un producto alimenticio, que comprende una etapa de disolución de la preparación enzimática según la reivindicación 1 en una solución, una etapa de desplazamiento del pH de la solución resultante a un intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime, y una etapa subsiguiente de inyectar la solución resultante en un material alimenticio realizándose a continuación una reacción de transglutaminasa.
15. Procedimiento para producir un producto alimenticio según la reivindicación 14, en el que el intervalo de pH en el que la expresión de la actividad transglutaminásica se suprime es pH 3 o más a menos que pH 5 o pH 10 o más a pH 12 o menos.
16. Procedimiento para producir un producto alimenticio según la reivindicación 14, en el que el producto alimenticio es un producto muscular entero producido sin utilizar carne picada.
17. Procedimiento para producir un producto alimenticio, que comprende una etapa de disolver en una solución tres

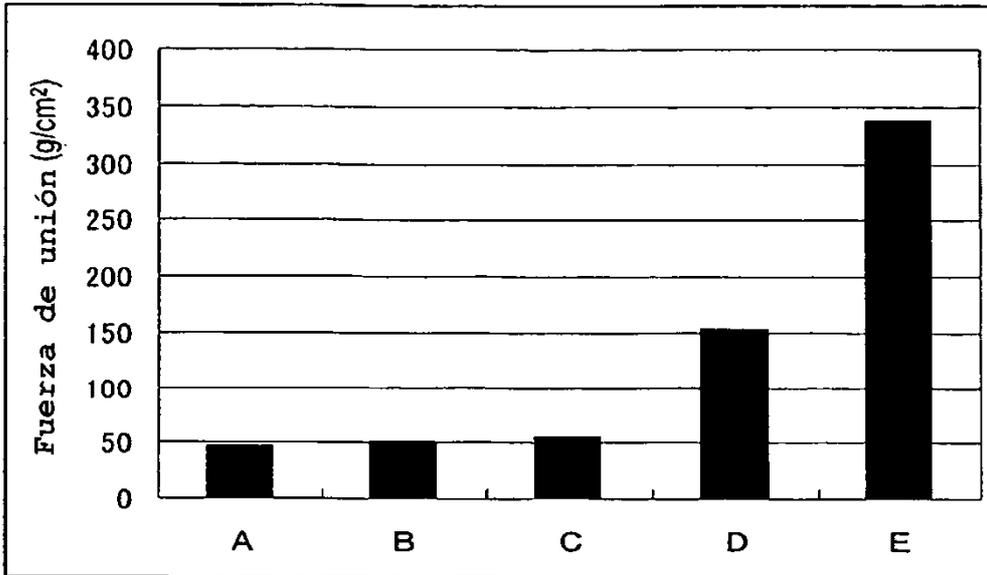
ES 2 441 414 T3

componentes de 1) transglutaminasa, 2) colágeno y 3) una sustancia ácida o alcalina que desplaza el pH de la solución resultante a un intervalo de pH, en el que la expresión de la actividad de la transglutaminasa se suprime, y una etapa de mezclado de materiales alimenticios con la solución resultante para retrodesplazar el pH de la mezcla resultante a un intervalo de pH en el que la actividad de la transglutaminasa se expresa, realizándose a continuación una reacción de transglutaminasa.

5

Fig. 1

Fuerza de unión utilizando varios tipos de colágenos



A, B, C, D y E en esta figura corresponden a A, B, C, D y F en tabla 1

Fig. 2

Dependencia del pH y estabilidad de la actividad transglutaminásica

