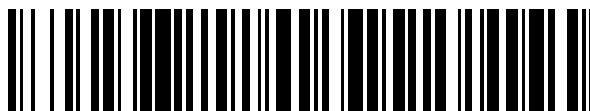


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 480 540**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/00** (2006.01)

**A23L 1/317** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**A23L 1/0562** (2006.01)

**A23J 3/22** (2006.01)

**A23J 3/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2008 E 08739646 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2138049**

54 Título: **Preparación enzimática para la adherencia y procedimiento de producción de un producto alimenticio moldeado por adherencia**

30 Prioridad:

**29.03.2007 JP 2007086631**

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

**28.07.2014**

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)  
15-1, KYOBASHI 1-CHOME  
CHUO-KU, TOKYO 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**ISHIDA, RIKIYA y  
OGAWA, TEPPEI**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 480 540 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 para la adherencia y procedimiento de producción de un producto alimenticio moldeado por adherencia.

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a una preparación enzimática para ligazón y a un procedimiento de producción de un alimento conformado y ligado.

10

**Técnica anterior**

Se han realizado muchos informes con respecto a una tecnología para la ligazón y el conformado de un material alimenticio, utilizando una transglutaminasa.

15

La patente japonesa nº 1927253 da a conocer una tecnología para la producción de un alimento conformado y ligado, utilizando sólo una transglutaminasa. La invención consistió en una tecnología avanzada que desarrolló una nueva utilización de la transglutaminasa pero, debido a la falta de poder obtener una fuerza suficiente de ligazón, se realizaron muchos estudios relativos a la utilización combinada con varios componentes, para poder utilizar prácticamente la tecnología.

20

Asimismo, cada una de las patentes japonesas nº 3353383 y nº 3353503 dan lugar a una invención con respecto a un alimento conformado y ligado, obtenido combinando una transglutaminasa y caseínas, que se utilizan como un sustrato para la transglutaminasa. Estos procedimientos son ampliamente aplicables a materiales alimenticios que incluyen carnes de pescado, tales como calamares, mariscos, como cangrejos, huevos de salmón (ikura), huevos de arenque (sujiko) y huevos de bacalao, sin limitación para las carnes animales. Asimismo, ya que estos procedimientos permitieron el ligazón de alimentos crudos, estas invenciones se refieren a un procedimiento para el conformado y el ligazón que no influya sobre el sabor y el olor, y que es ampliamente versátil.

25

Mientras tanto, debido a recientes problemas de alergia a los alimentos, una proteína de origen lácteo no se utiliza, en algunos casos, en los alimentos procesados. Por tanto, los procedimientos de ligazón que utilizan una combinación de una transglutaminasa y una proteína distinta a las caseínas, también se han estudiado.

30

La patente japonesa nº 3407599 da a conocer un procedimiento de ligazón y conformado que utiliza colágeno y una transglutaminasa como principios activos, sin utilizar la caseína combinada. Sin embargo, ya que el colágeno muestra la propiedad de expresar una viscosidad elevada cuando se disuelve en el agua, es esencial disolver el colágeno en agua fría de 10°C o menos, siendo necesario iniciar la operación de ligazón de forma rápida después de la disolución, lo que implica por lo tanto un tipo de problema en la capacidad de trabajo.

35

Asimismo, ya que la fuerza de ligazón es débil sin utilizar una sal, es difícil esperar un efecto práctico cuando no se utiliza dicha sal.

40

La publicación internacional WO 02/080700 da a conocer una preparación enzimática para el ligazón de materiales alimenticios, que comprende como principios activos un colágeno específico en el que el número de residuos totales de hidroxiprolina y prolina (a los que se hace referencia a veces a continuación en la presente invención como aminoácidos en el colágeno es inferior al 20% del número de residuos aminoácidos totales en éste, y una transglutaminasa y un procedimiento para obtener un alimento conformado y ligado utilizando para el ligazón la preparación enzimática de ligazón. Asimismo, el documento JP-A-2006-24671 da a conocer un procedimiento para producir un alimento conformado y ligado utilizando un agente de ligazón alimenticio que contiene una transglutaminasa, colágeno, un agente que ajusta el pH tal como ácido cítrico o fosfato trisódico, y cloruro de calcio, y que se describe como "cloruro de calcio o similar que puede añadirse preferentemente, ya que su adición permite suprimir la congelación del colágeno a baja temperatura". Sin embargo, la publicación no da a conocer la cantidad apropiada del cloruro de calcio que va a añadirse.

45

50

Como colágeno específico anteriormente mencionado puede utilizarse un colágeno derivado dérmico del pescado, no utilizándose esta preparación que contiene el colágeno del pescado para los alimentos procesados de carne animal que utilizan cerdo, ternera, y pollo en algunos casos, ya que el colágeno del pescado constituye una proteína de distinto origen.

55

Particularmente, en el mercado europeo, es obligatorio el marcado de los alimentos de alergia que utilizan material derivado del pescado, restringiéndose más en algunos casos la utilización del material derivado del pescado para los alimentos procesados de carne animal, comparado con otros países.

60

Anteriormente no se ha desarrollado una tecnología para expresar la fuerza práctica de ligazón utilizando el colágeno derivado del cerdo, ternera o pollo.

65

**Exposición de la invención**

5 Considerando los antecedentes descritos anteriormente, existe una demanda en la industria de procesamiento alimentario de una buena preparación enzimática para el ligazón y el conformado, y de un procedimiento de obtención de alimentos conformados y ligados que puedan ligarse y conformarse satisfactoriamente, tales como piezas de carne, sin utilizar un material derivado del pescado. Por tanto, constituye un objetivo de la presente invención proporcionar una buena preparación enzimática para el ligazón y el conformado y un procedimiento de de producción de alimentos conformados y ligados.

10 Se realizó una investigación exhaustiva con la finalidad de solucionar los problemas anteriormente descritos, para descubrir que es posible un material alimenticio tal como la carne de ganado, utilizando una transglutaminasa, colágeno y cloruro de calcio y/o cloruro de magnesio, cumpliendo con esta invención. Más específicamente, la presente invención, es tal como se describe a continuación.

15 1) Una preparación enzimática que incluye como principios activos una transglutaminasa derivada de un microorganismo, colágeno animal que no incluye pescado y colágeno de crustáceos y cloruro de calcio o cloruro de magnesio en la que una cantidad de cloruro de calcio o cloruro de magnesio en la preparación enzimática se encuentra comprendida entre 0,007 y 0,03 g por 1 unidad de transglutaminasa en la preparación enzimática, y una cantidad del colágeno en ésta se encuentra comprendida entre 0,002 y 0,03 g por 1 unidad de la transglutaminasa en ella.

20 2) La preparación enzimática según 1), en la que la resistencia de gel del colágeno incluido en la preparación enzimática es de 40 g o superior.

25 3) La preparación enzimática según 1), en la que una resistencia de gelatina del colágeno incluido en la preparación enzimática es de 150 g o superior.

4) La preparación enzimática según 3), en la que el colágeno es un colágeno tratado con ácidos.

30 5) Un procedimiento para obtener un alimento conformado y ligado, en el que la preparación enzimática según 1) a 4), se disuelve (1) en agua o en un líquido que debe añadirse a un material alimenticio, o (2) debe añadirse directamente a un material alimenticio.

35 6) Procedimiento para obtener un alimento conformado y ligado, en el que, de 10 a 100 unidades de una transglutaminasa, de 0,1 a 2 g de colágeno animal que no incluye pescado y de colágeno de crustáceos, y de 0,4 a 2 g de cloruro de calcio o magnésico por 100 g del material alimenticio son (1), disueltos en agua o en un líquido que debe añadirse a un material alimenticio, o (2), añadidos directamente a dicho material

40 7) El procedimiento según 6), en el que la resistencia de gel del colágeno comprendido en la preparación enzimática es de 40 g o superior.

8) El procedimiento según 6), en el que la resistencia de gelatina del colágeno comprendido en la preparación enzimática, es de 150 g o superior.

45 9) El procedimiento de producción de los alimentos conformados y ligados según 8), en el que el colágeno es un colágeno tratado con ácidos.

50 La presente invención se describirá con mayor detalle a continuación. La presente invención se caracteriza por que da lugar a (1) que el colágeno y (2) el cloruro de calcio o cloruro de magnesio actúen como una preparación enzimática para unirse además al efecto enzimático de una transglutaminasa.

55 La transglutaminasa que debe utilizarse en la presente invención es una enzima que se utiliza para catalizar una reacción que transfiere acilos a un grupo  $\gamma$ -carboxiamida en un residuo de glutamina en una cadena peptídica o de proteínas. Se forma un enlace  $\epsilon$ -( $\gamma$ -Glu)-Lys en y entre moléculas proteicas por la acción de la transglutaminasa como un receptor acilo, que se lleva a cabo sobre un grupo  $\epsilon$ -amino de un residuo de lisina en la proteína.

60 Como transglutaminasas que se van a utilizar como enzimas en la presente invención, se incluyen las derivadas de un microorganismo tal como las derivadas de actinomicetos (véase patente japonesa nº 2572716), y las derivadas de Bacillus subtilis (véase patente japonesa nº 3873408). Asimismo, los ejemplos de transaminasas incluyen las derivadas del hígado de cobayas (véase patente japonesa nº 1689614), las derivadas de un microorganismo (véase el documento WO96/06931), las derivadas de un animal, tales como sangre de vaca y de cerdo; las derivadas de pescados tales como salmón y besugos rojos (Seki et al.; Journal of Japanes Society of Fisheries Science; 1990; 56; 125-132), las derivadas de las ostras (véase la patente US nº 5.736.356; y similares.

65 Asimismo, los ejemplos de las transglutaminasa incluyen los producidos mediante recombinación génica (por ejemplo, véase las patentes Japonesas números 3010589, JP-A-11-75876, WO 01/23591, WO 02/081694,

WO 2004/078973), y similares.

5 Tal como se describe anteriormente, se puede utilizar cualquiera de las transglutaminasas que se han presentado previamente. Desde el punto de vista de la funcionalidad y de la facilidad de manipulación para la utilización en los alimentos, resulta preferido utilizar las transglutaminasas derivadas de microorganismos, ya que se obtienen en masa y están disponibles a bajo coste (nº de registro 2572716 y similares).

10 Una unidad de actividad transglutaminásica que puede utilizarse en la presente invención, se calcula y define tal como se describe a continuación. Específicamente, se lleva a cabo una reacción utilizando benciloxicarbonil-L-glutaminilglicina e hidroxilamina como sustrato, y, después de convertir el ácido hidroxámico así generado en un complejo de hierro en presencia de ácido tricloroacético, una cantidad del complejo férrico, se mide a una absorbancia de 525 nm. Una cantidad del enzima que permite generar 1 micromol de ácido hidroxámico en un minuto, se define como una unidad, que constituye una unidad de actividad de la transglutaminasa. Ya se ha informado de detalles de este procedimiento de evaluación, que se denomina procedimiento del hidroxamato (por ejemplo, véase el registrado con el nº 2572716).

20 Tal como se ha descrito anteriormente, es conocido que la transglutaminasa tiene orígenes diversos. Existen también algunas transglutaminasas cuya actividad no puede definirse mediante un procedimiento del hidroxamato, debido a la especificidad de sustrato. En tal caso, la unidad se define mediante un método distinto. Una cantidad que alcance sustancialmente el efecto de moldeamiento y de compactación de la presente invención, es del orden de la adición de la transglutaminasa de la presente invención, independientemente del procedimiento de medida de la actividad utilizado para la definición.

25 El cloruro de calcio y el cloruro de magnesio que muestran un grado que puede utilizarse para los alimentos, pueden utilizarse en la presente invención, pudiendo hacerlo solos o combinados.

30 Como colágeno que constituya un componente esencial en esta invención, puede utilizarse cualquier tipo. Más específicamente, no están particularmente limitados los materiales para el colágeno que vayan a utilizarse en la presente invención, pudiéndose utilizar los extraídos de tejidos como piel, huesos, cartílagos, escamas, vejiga y similares de un colágeno animal que no incluya el colágeno de pescado y marisco. El efecto de ligazón mejora considerablemente utilizando colágeno añadido a una sal que se describe a continuación en la presente descripción detallada y de la transglutaminasa.

35 Tal como se utiliza en la presente invención, el colágeno se refiere al obtenido a partir de la piel, hueso, cartílago, escamas y vejiga de un animal mediante extracción y purificación y de un grado de modificación tal, que la descomposición no está limitada. Ya que el colágeno se hidroliza en varios grados durante la extracción, muestra generalmente un amplio margen de distribución del peso molecular, y los que se conforman en una denominada gelatina, alcanzando un peso molecular bajo, se encuentran dentro del intervalo del colágeno de la presente invención. Además, el colágeno no es necesariamente una sustancia purificada, y las grasas, hidratos de carbono péptidos, aminoácidos y similares pueden contenerse parcialmente en él.

45 Entre los colágenos, se prefieren los que se obtienen sin llevar a cabo un tratamiento ácido o un tratamiento con álcalis y similares, ya que dicho colágeno contribuye a la obtención de una fuerza de ligazón más intensa, resultando más preferido utilizar el colágeno que muestra una resistencia de gel de 40 g o superior. La resistencia de gel se calcula tal como se describe a continuación. Después de disolver el colágeno en agua caliente a 30°C durante 1 hora para alcanzar una concentración del 5%, 50 ml del colágeno se vierten con un único propósito en un recipiente de gelatina, sellándose éste, y enfriándose en una nevera a 5°C durante 17 horas. Después del enfriamiento, el gel se somete a medición, utilizando un dispositivo de medición de las propiedades físicas, tal como un analizador de la textura y un reómetro, utilizando una sonda cilíndrica con un diámetro de 5 mm, con una velocidad de intrusión de 1 mm/seg y una distancia de intrusión de 8 mm, constituyendo la resistencia de gelatina el valor del estrés (g) así detectado.

50 En el caso de utilizar colágeno sometido al tratamiento ácido o al de los álcalis, la resistencia de gelatina del colágeno puede ser de 150 g o más, preferentemente de 150 a 300 g, más preferentemente de 250 a 300 g, ya que dicho colágeno expresa una fuerza de ligazón más intensa, utilizándose apropiadamente.

60 La resistencia de gelatina se mide tal como se describe a continuación. Después de disolver el colágeno para alcanzar una concentración del 6,67%, 120 ml del colágeno se vierten con un único propósito en un recipiente gelatinoso dejándose enfriar hasta 35°C a temperatura ambiente. A continuación, se cubre el recipiente gelatinoso con una tapa de goma, situándose el recipiente gelatinoso en un incubador a 10°C, para que se enfríe durante 17 horas. El gel, después de enfriarse se somete a medición, utilizándose un dispositivo de medición tal como un analizador de textura y un reómetro, utilizando una sonda cilíndrica con un diámetro de 12,7 mm, con una velocidad de intrusión de 1 mm/seg y una distancia de intrusión de 4 mm, siendo la resistencia de gelatina el valor del estrés (g) así detectado (véase JIS K 6503).

65 Para obtener otra fuerza de ligazón más intensa, resulta más preferido utilizar el colágeno que se somete al

- tratamiento ácido durante su proceso de obtención, que el colágeno que se utiliza tratado con álcalis. El colágeno tratado con ácidos y el tratado con álcalis difieren entre ellos en el punto isoeléctrico, mostrando el tratado con ácidos un nivel de pH de 6,5 a 9,0 aproximadamente, mientras que el colágeno tratado con álcalis exhibe un nivel de pH de entre 4,9 a 5,2. Se lleva a cabo una prueba, utilizando el procedimiento PAGI (Commission on Methods for Testing Photographic Gelatin; método PAGI; novena edición de 2002 del método PAGI) como método de evaluación. En el procedimiento PAGI utilizado en la presente invención, se fija como un punto isoeléctrico un nivel de pH de una solución que se obtiene mediante eliminación, a partir de una solución de gelatina, de sustancias iónicas, utilizando una resina obtenida mezclando una resina de intercambio aniónico y una resina de intercambio catiónico.
- Con respecto a la tasa de formulación de la transglutaminasa, del colágeno, del cloruro de calcio o del cloruro de magnesio que forman la preparación enzimática de la presente invención, se añaden de la siguiente forma: de 1 a 200 unidades de transglutaminasa, de 5 a 95 partes en peso de cloruro de calcio o de cloruro de magnesio y de 5 a 95 partes en peso del colágeno por 100 partes en peso de la preparación enzimática. Con respecto a las proporciones de los componentes, una cantidad de cloruro de calcio o del cloruro de magnesio (una cantidad total de cloruro de calcio y cloruro de magnesio en el caso de su utilización combinada) por 1 U de la transglutaminasa en la preparación enzimática, puede estar preferentemente entre 0,007 y 0,03 g, más preferentemente entre 0,01 y 0,02 g, y un peso seco del colágeno por 1 U de la transglutaminasa en la preparación enzimática, puede estar preferentemente entre 0,002 y 0,03 g, más preferentemente entre 0,003 y 0,007 g.
- La preparación enzimática para la ligazón de la presente invención contiene como principios activos la transglutaminasa, el colágeno y el cloruro de calcio y/o cloruro de magnesio, y diversos componentes arbitrarios que se describen a continuación y que pueden añadirse. Por ejemplo, pueden añadirse los que se conocen como diluyentes alimentarios tales como lactosa, sacarosa, maltitol, sorbitol, dextrina, dextrina ramificada, ciclodextrina, dióxido de silicio, celulosa, almidón, polisacáridos, una goma, pectina y similares.
- Además, para la ligazón de la preparación enzimática, es posible utilizar una proteína distinta que el colágeno, tal como una proteína extraída de carne animal, que incluye cerdo y ternera, una proteína extraída de las aves de corral domésticas, una proteína de soja, una proteína de trigo y una caseína. Asimismo, puede utilizarse un hidrolizado parcial de estas proteínas (proteínas de soja parcialmente hidrolizadas, proteínas de trigo parcialmente hidrolizadas, etc.).
- Asimismo, pueden añadirse a la preparación enzimática carbonato sódico de hidrógeno, citrato sódico, fosfato sódico, calcio calcinado, fosfato cálcico, carbonato cálcico, carbonato magnésico, cloruro sódico, cloruro potásico, o tipos de polifosfatos, como pirofosfatos sódico, tripolifosfato sódico, y metafosfato sódico. Además, puede añadirse sin ninguna dificultad un saborizante, un azúcar, una especia, un colorante, un formador de color, ácido ascórbico y sus sales, un emulsificante, un aceite y similares.
- En la preparación enzimática para la ligazón y el conformado de la presente invención, la transglutaminasa, el colágeno, y el cloruro de calcio o el magnésico, no se mezclan necesariamente en un contenedor, sino que la preparación enzimática comprende un denominado "kit", en el que la transglutaminasa, el colágeno y el cloruro de calcio o magnésico, están contenidos independientemente en contenedores separados. La preparación enzimática puede estar en forma de polvo o líquida.
- En el caso de obtener un alimento conformado y ligado mediante la compactación de un material alimenticio, se consideran cada uno de los procedimientos siguientes. Específicamente, puede utilizarse un procedimiento para utilizar la preparación enzimática que contiene como principios activos la transglutaminasa, el colágeno y el cloruro de calcio o cloruro de magnesio, y un procedimiento para utilizar la transglutaminasa, el colágeno y el cloruro de calcio o cloruro de magnesio que se obtienen separadamente.
- En cada uno de los procedimientos, una cantidad de transglutaminasa que puede utilizarse para el material alimenticio puede ser la de 1 a 400 unidades, preferentemente de 10 a 200 unidades, por 100 g del material alimenticio utilizado como objeto de la ligazón. Una cantidad de colágeno que se utiliza por 100 g del material alimenticio, puede ser de entre 0,02 a 5 g, preferentemente de 0,1 a 2 g. Una cantidad del cloruro de calcio o cloruro de magnesio que se utiliza (una cantidad total del cloruro de calcio y cloruro de magnesio en el caso de utilización combinada) por 100 g del material alimenticio, puede estar entre el 0,02% y el 5%, preferentemente entre el 0,4 y el 2%.
- En el caso de obtener un alimento conformado y ligado mediante la ligazón de un material alimenticio, se consideran los procedimientos siguientes. Específicamente, mediante la disolución de la preparación enzimática para la ligazón de la presente invención a un disolvente, o mediante la mezcla de la preparación enzimática en forma pulverulenta, de forma directa, con el material alimenticio. Más específicamente, la disolución de cada uno de los componentes esenciales como la transglutaminasa y la mezcla, separada o simultáneamente de los componentes con el material alimenticio, o la utilización de cada uno de los componentes esenciales, tal como la transglutaminasa, separada o simultáneamente, en forma pulverulenta, con el material alimenticio. Un caso en el que se utilice cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos, comprende el procedimiento de obtención del alimento conformado y ligado de la presente invención.

Como material alimenticio que va a utilizarse en la presente invención puede utilizarse cualquier material proteico. Por ejemplo, no sólo las denominadas carnes comestibles, tales como la de ternera, cerdo, de caballo, de oveja, de cabra, de conejo y pollo, sino también pueden utilizarse otros materiales alimenticios, incluyendo carnes de pescado, crustáceos, crustáceos tales como cangrejos y gambas, moluscos, tales como calamares y pulpos, huevos de pescado, tales como salmón, huevos de salmón (ikura) y huevos de salmón (sujiko). Además, pueden utilizarse alimentos procesados, tales como queso, pasta, y embutidos de pescado. Por supuesto que los materiales alimenticios mencionados anteriormente no son limitativos.

El alimento conformado y ligado de la presente invención constituye un alimento conformado/reconstruido que se obtiene ligando diversas piezas alimentarias obtenidas cortando el material alimenticio en tamaños apropiados (por ejemplo, los obtenidos mediante piezas de carne ligadas y conformadas, con tamaños, cada una, de  $1 \text{ cm}^3$ ) y un alimento reconstruido obtenido ligando diversas piezas del material obtenido sin cortar (por ejemplo, las obtenidas ligando y obteniendo un conjunto de piezas de material alimenticio de pequeño tamaño, siendo éste de  $1 \text{ cm}^3$  o menor, tal como huevos de salmón y gambas), material que no incluye alimentos producidos a partir de los de tipo pasta obtenidos mediante homogenización o picado, tales como material picado, o en forma de pasta. Sin embargo, un alimento que se obtiene mediante la ligazón y la formación de piezas pequeñas (no una pasta) de un embutido de pescado o de uno que una vez se forma, se incluye entre los alimentos unidos y moldeados de la presente invención.

La unión de las piezas alimentarias o de las piezas de pequeño material alimentario es necesaria para alcanzar una resistencia a la tracción de  $80 \text{ g/cm}^2$  o superior, que se detecta mediante un reómetro (fabricado por Fudo Kogyo KK). La resistencia a la tracción de  $80 \text{ g/cm}^2$  o inferior no es apropiada para la utilización práctica, ya que dicha resistencia provoca que las piezas se rompan durante la obtención de los alimentos ligados y conformados, o durante el proceso de cocinado.

La presente invención puede aplicarse a todos los materiales alimenticios proteicos tal como se han descrito anteriormente, siendo posible obtener los alimentos ligados y conformados utilizando proteínas originales, en el caso de que la preparación enzimática de la presente invención, que se prepara utilizando el colágeno derivado de la ternera, se utilice para ésta como material alimenticio, o en el caso de que la preparación enzimática de la presente invención que se prepara utilizando el colágeno derivado del cerdo, se utilice para éste como material alimenticio, solucionando por lo tanto el problema en la industria de procesamiento cárnico que solicite alimentos que no contengan proteínas de distintos orígenes, y estén libres de marcadores alérgicos.

### Breve descripción de las figuras

La figura 1 es un gráfico que muestra las relaciones entre sales y la fuerza de ligazón (Ejemplo 1).

La figura 2 es un gráfico que muestra las relaciones entre colágenos y la fuerza de ligazón (Ejemplo 2).

La figura 3 es un gráfico que muestra las relaciones entre colágenos y una fuerza de ligazón (Ejemplo 3).

### Mejor modo de poner en práctica la invención

La presente invención se describirá a continuación basándose en ejemplos. Un alcance técnico de la presente invención no se limita a los ejemplos.

#### Ejemplo 1: obtención de cerdo ligado y conformado mediante la transglutaminasa, colágeno y sales.

Una transglutaminasa comercialmente disponible originada en *Streptomyces mobaraensis* (actividad específica: 1000 unidades/g; TG "Activa"; fabricada por Ajinomoto Co., Inc.), se utilizó como transglutaminasa. *Streptomyces mobaraensis* se denominó *Streptoverticillium mobaraense* antes del 1990.

Como colágeno, se utilizó un polvo fino de Gelatina G, fabricado por Nitta Gelatin Inc. (colágeno tratado con ácido con una resistencia de gelatina de 256 g).

En cada una de las muestras de ensayo, 1,2 g del colágeno (Polvo fino de Gelatina G, fabricado por Nitta Gelatin Inc.), y 1,5 de una sal, se pesaron y disolvieron en 10 ml de agua. Se pesó la transglutaminasa, disolviéndose 180 U de ésta en 2 ml de agua, mezclando a continuación la solución mencionada anteriormente. La solución de mezcla obtenida es la preparación enzimática de la presente invención.

Las condiciones anteriormente descritas son las mismas que las proporciones aditivas, cuando una parte en peso de la preparación enzimática que se prepara utilizando 40 g de colágeno por 100 g y 50 g de la sal por 100 g de ésta se añaden 60 U de la transglutaminasa por 1 g de la preparación enzimática, a 100 partes en peso de un material alimenticio.

Cada una de las preparaciones enzimáticas obtenidas tal como se ha descrito anteriormente, se mezcló con 300 g de piezas pequeñas (cubos de aproximadamente 2 cm) de jamón de cerdo, rellenando con la mezcla un tubo con

carcasa que presentaba una anchura plegable de 75 mm, dejándose reposar a 5°C durante 2 horas para que progresara la reacción de la transglutaminasa. Después de haberla dejado reposar, la mezcla se guardó en una nevera a -40°C para el almacenamiento congelado hasta que se realizara la evaluación.

- 5 Las cantidades añadidas del colágeno y de la sal a cada una de las muestras de prueba, equivalen a 0,4 g del colágeno y a 0,5 g de la sal por 100 g del material alimenticio. Asimismo, la cantidad añadida de la transglutaminasa equivale a 0,6 U por 1 g del material alimenticio. Los detalles se muestran en la Tabla 1

10 TABLA 1. Composición (cantidades añadidas por 300 g de carne)

	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 5
Transglutaminasa (0,6 U por 1 g de material alimenticio en cualquiera de las muestras de prueba)	180 U	180 U	180 U	180 U	180 U
Colágeno tratado con ácido (0,4 g por 100 g de material alimenticio en cada una de las muestras de prueba)	1,2 g	1,2 g	1,2 g	1,2 g	1,2 g
Sal (0,5 g por 100 g de material alimenticio en cada una de las muestras de prueba, excepto si la sal no se añade)	La sal no se añadió	1,5 g de cloruro sódico	1,5 g de cloruro potásico	1,5 de cloruro cálcico	1,5 g de cloruro magnésico

Se obtuvo una rodaja de un grosor de 9 mm y una anchura de 25 mm, a partir de cada una de las piezas de cerdo congelado, y después de descongelarlo, se midió, utilizando un reómetro (fabricado por Fudo Kogyo KK), la resistencia a la tracción de la rodaja en condiciones brutas. Los resultados se muestran en la figura 1. Aunque se considera que una resistencia a la tracción de 80 g/cm<sup>2</sup> constituye una fuerza práctica de ligazón en este procedimiento de evaluación, la muestra de prueba a la que se añadió el cloruro de calcio o magnésico, alcanzó la fuerza de ligazón que excedía al valor de referencia (80 g/cm<sup>2</sup>). Específicamente, la muestra de prueba a la cual se añadió el cloruro de calcio, alcanzó la fuerza de ligazón de 205,8 g/cm<sup>2</sup>, y la muestra de prueba a la que se añadió el cloruro de magnesio, alcanzó la fuerza de ligazón de 136,1 g/cm<sup>2</sup>. Contrariamente a esto, la muestra de prueba a la que no se añadió la sal, alcanzó la fuerza de ligazón de 39,3 g/cm<sup>2</sup>; la muestra de prueba a la que se añadió el cloruro de sodio, alcanzó la fuerza de ligazón de 35,4 g/cm<sup>2</sup>; y la muestra de prueba a la que se añadió cloruro potásico, alcanzó la fuerza de ligazón de 30,0 g/cm<sup>2</sup>, que no constituyen fuerzas prácticas de ligazón.

25 **Ejemplo 2. Tipo de colágeno y su influencia sobre la fuerza de ligazón.**

1,2 g de cada uno de los colágenos que se muestran en la Tabla 2, y 1,5 g de cloruro de calcio, se disolvieron en 10 ml de agua. Se pesó la transglutaminasa, y 180 U de ésta se disolvieron en 2 ml de agua, seguido por la mezcla con la solución mencionada anteriormente del colágeno y del cloruro de calcio. La solución de mezcla obtenida constituye la preparación enzimática de la presente invención.

30 TABLA 2: Características del colágeno

Nombre del producto	Procedimiento de extracción	Valor actual de medición de la fuerza
Polvo fino AP200 (fabricado por Nitta Gelatin Inc.)	Tratamiento	199 g
Polvo fino G (fabricado por Nitta Gelatin Inc.)	Tratamiento	256 g
Polvo fino GBL250 (fabricado por Nitta Gelatin Inc.)	Tratamiento	265 g

35 Cada una de las preparaciones enzimáticas obtenidas tal como se da a conocer anteriormente, se mezcló con 300 g de piezas pequeñas (cubos de aproximadamente 2 cm) de jamón de cerdo, rellenando con esta mezcla un tubo con carcasa que presentaba una anchura plegable de 75 mm que permaneció a 5°C durante 2 horas, para que progresara la reacción de la transglutaminasa. Después de esto, la mezcla se guardó en una nevera a -40°C para que permaneciera congelada, hasta llevar a cabo la evaluación. Después de ésta, se midieron las resistencias a la tracción de la misma manera que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 2.

40 Las cantidades que se añadieron de colágeno y de cloruro de calcio equivalen a 0,4 g de colágeno y 0,5 g del cloruro de calcio por 100 g del material alimentario. Asimismo, la cantidad que se añadió de la transglutaminasa es equivalente a 60 U por 100 g del material alimenticio. Los detalles se muestran en la Tabla 3.

45 TABLA 3: Composición (cantidades añadidas por 100 g de carne)

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Transglutaminasa (0,6 U por 1 g de material alimenticio en cada una de las muestras de prueba)	180 U	180 U	180 U
Colágeno utilizado (0,4 g por 100 g de material alimenticio en cada	1,2 g de polvo	1,2 g de polvo	Polvo fino

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
una de las muestras de prueba	fino AP200	fino G	GBL250
Cloruro de calcio (0,5 g por 100 g de material alimenticio en cada una de las muestras de prueba, excepto si la sal no se añade)	1,5 g	1,5 g	1,5 g

Tal como se muestra en la figura 2, se confirmó que es posible alcanzar la fuerza más intensa de ligazón de 154,7 g/cm<sup>2</sup> utilizando el polvo G que muestra la resistencia alta de la gelatina.

- 5 Asimismo, a partir de que la fuerza de ligazón alcanzada por GBL-250 es de 82,1 g/cm<sup>2</sup> y que la fuerza de ligazón alcanzada por el polvo fino AP200 es de 106,5 g/cm<sup>2</sup> se confirmó que el colágeno tratado con ácidos permite obtener la fuerza de ligazón más intensa, comparada con el colágeno tratado con álcalis.

**Ejemplo 3: Tipo de colágeno y su influencia sobre la fuerza-2 de ligazón**

- 10 Se disolvieron 1,2 g de cada uno de los colágenos que se muestran en la Tabla 4, y 1,5 g del cloruro de calcio, en 10 ml de agua. Se pesó la transglutaminasa y 180 U de ésta se disolvieron en 2 ml de agua, seguido por la mezcla con la solución anteriormente mencionada del colágeno y del cloruro de calcio. La solución de mezcla obtenida constituye la preparación enzimática de la presente invención.

15

TABLA 4: Características del colágeno

Nombre del producto	Material de origen	Valor actual de la medicación de la fuerza gélica
T95-S (fabricado por BHJ)	Piel de cerdo	50 g
WB 1/20KD (fabricado por Prowico)	Piel de cerdo	13 g
WB 1/40KD (fabricado por Prowico)	Piel de cerdo	27 g

20

Cada una de las preparaciones enzimáticas obtenidas tal como se describe anteriormente, se mezcló con 300 g de piezas pequeñas (cubos de aproximadamente 2 cm) de jamón de cerdo, rellenándose con la mezcla un tubo con carcasa que mostraba una anchura plegable de 75 mm, y dejándose permanecer a 5°C durante 2 horas para el progreso de una reacción de la transglutaminasa. Después de esto, la mezcla se guardó en una nevera a -40°C para almacenamiento congelado, hasta realizar la evaluación. Después de esto, se midieron las resistencias a la tracción de la misma forma que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la figura 3. Con objeto de medir una fuerza de ligazón después del calentamiento, una rodaja con un grosor de 9 mm de cada una de las carnes ligadas, se calentó a 240°C durante 150 segundos por cada lado, midiéndose la fuerza mediante evaluación sensitiva. Los puntos estándares para la evaluación sensorial. Los puntos estándares para la evaluación estándar son tal como se muestran en la Tabla 5, llevándose a cabo mediante 3 sujetos suficientemente entrenados. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

25

30

Las cantidades añadidas del colágeno y del cloruro de calcio son equivalentes a 0,4 g del colágeno y a 0,5 g del cloruro de calcio por 100 g del material alimenticio. Asimismo, la cantidad añadida de la transglutaminasa es equivalente a 60 U por 100 g del material alimenticio. Los detalles se muestran en la Tabla 6.

35

TABLA 5: Estándares de evaluación sensorial

Índice de evaluación sensorial	Estado del ligazón
1	Rotura en piezas después del calentamiento
2	Las piezas se ligaron, pero se observó una gran fisura
3	No se observó fisura, pero se desprendió fácilmente cuando se realizó tracción
4	No se desprendió fácilmente cuando se realizó tracción. Se obtuvo una fuerza práctica
5	Se alcanzó una fuerza intensa de ligazón, de forma que una pieza que no se encuentra en la superficie de unión, se deforma cuando se ejerce tracción

TABLA 6: Composición (cantidades añadidas por 300 g de carne) y resultados de evaluación sensorial

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Colágeno que se utiliza (0,4 g por 100 g de material alimenticio en cada una de las muestras de prueba)	1,2 g de T95-S (derivada de la piel del cerdo; fuerza del gel: 50 g)	1,2 g de WB 1/20KD (derivada de la piel del cerdo; fuerza del gel: 13 g)	1,2 g de WB 1/40KD (derivada de la piel del cerdo; fuerza del gel: 27 g)
Cloruro cálcico (0,5 g por 100 g de material alimenticio en cada una de las muestras de prueba, excepto si la sal no se añade)	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Transglutaminasa (0,6 U por 1 g de material alimenticio en cada una de las muestras de	180 U	180 U	180 U



prueba			
Índice evaluación después de calentamiento	4	2	3

Tal como se muestra en la figura 3, se confirmó que es posible alcanzar la fuerza más intensa de ligazón de 85,5 g/cm<sup>2</sup> utilizando el colágeno que posee la elevada resistencia de gelatina.

5 **Aplicabilidad industrial**

La presente invención puede utilizarse para ligar un material alimenticio. Asimismo, la preparación enzimática de la presente invención da lugar no sólo a la fuerza satisfactoria de ligazón, sino también la textura favorable para un alimento conformado y ligado obtenido finalmente.

10 Con la utilización de la preparación enzimática y el procedimiento de producción para los alimentos conformados y ligados de la presente invención, es posible ligar y conformar el material alimenticio satisfactoriamente tal como piezas cárnicas sin utilizar un colágeno derivado del pescado. Por tanto, la presente invención constituye una tecnología excelente y altamente práctica que es muy esperada en la industria del proceso alimentario.

15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Preparación enzimática que comprende como principios activos una transglutaminasa derivada de un microorganismo, colágeno animal que no incluye colágeno de pescado y de crustáceo, y cloruro de calcio o cloruro de magnesio, en la que una cantidad de cloruro de calcio o de cloruro de magnesio en la preparación enzimática es de 0,007 a 0,03 g por 1 unidad de la transglutaminasa en la preparación enzimática, y una cantidad del colágeno en la preparación enzimática es de 0,002 a 0,03 g por 1 unidad de la transglutaminasa en la preparación enzimática.
- 10 2. Preparación enzimática según la reivindicación 1, en la que una resistencia de gel del colágeno comprendido en la preparación enzimática es de 40 g o superior.
3. Preparación enzimática según la reivindicación 1, en la que una resistencia de gelatina del colágeno comprendido en la preparación enzimática es de 150 g o superior.
- 15 4. Preparación enzimática según la reivindicación 3, en la que el colágeno es un colágeno tratado con ácido.
- 20 5. Procedimiento para producir un alimento conformado y ligado en el que la preparación enzimática según las reivindicaciones 1 a 4 es (1) disuelta en agua o un líquido que debe añadirse a un material alimenticio o (2) añadida directamente a un material alimenticio.
- 25 6. Procedimiento para producir un alimento conformado y ligado, en el que 10 a 100 unidades de una transglutaminasa derivada de un microorganismo, 0,1 a 2 g de colágeno animal que no incluye colágeno de pescado y de crustáceo y 0,4 a 2 g de cloruro de calcio o de cloruro de magnesio por 100 g del material alimenticio, (1) se disuelven en agua o un líquido que debe añadirse a un material alimenticio o (2) se añaden directamente a un material alimenticio.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que una resistencia de gel del colágeno comprendido en la preparación enzimática es de 40 g o superior.
- 30 8.- Procedimiento según la reivindicación 6, en el que una resistencia de gelatina del colágeno comprendido en la preparación enzimática es de 150 g o superior.
9. Procedimiento de producción de alimento conformado y ligado según la reivindicación 8, en el que el colágeno es un colágeno tratado con ácido.

FIG. 1

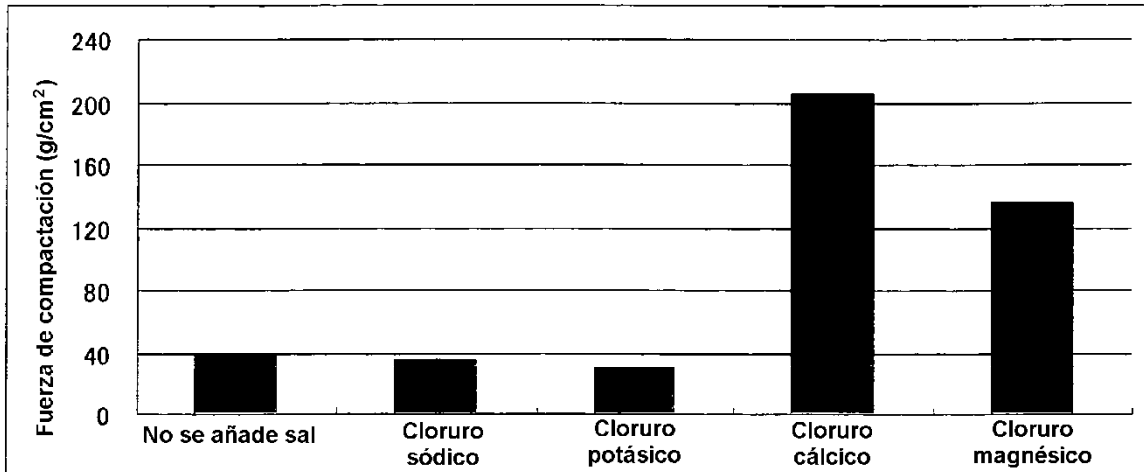


FIG. 2

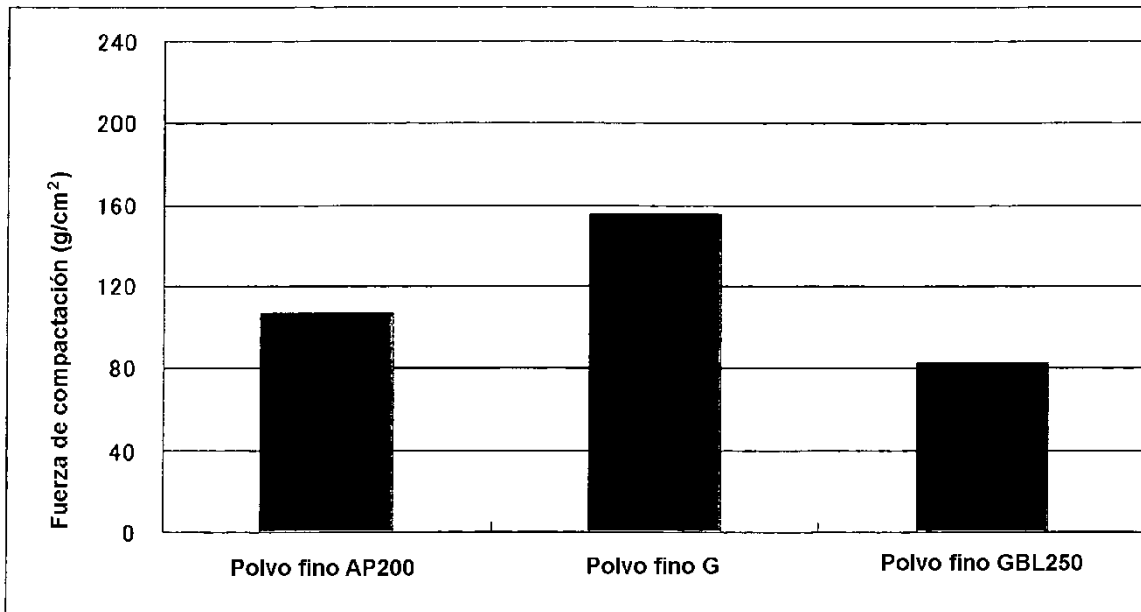


FIG. 3

