

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 857**

51 Int. Cl.:

A23J 3/04 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

A23J 1/08 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01)

A23L 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2007 E 07730155 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2034851**

54 Título: **Proteínas de huevo hidrolizadas**

30 Prioridad:

15.06.2006 EP 06115545

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

29.04.2015

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)
Avenue Nestlé 55
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**FRITSCHÉ, RODOLPHE;
SCHALLER, RAPHAEL y
CARTOU, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 857 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

Proteínas de huevo hidrolizadas

5 Ámbito de la presente invención

La presente invención se refiere a un proceso para reducir la alergenicidad de las proteínas de huevo.

10 Antecedentes de la presente invención

10 Las alergias alimentarias, de las cuales la más corriente es la alergia a la leche de vaca, están provocadas en la mayoría de los casos por una reacción a las proteínas que contiene el alimento. En los primeros años de la vida el sistema inmunitario aún se está desarrollando y puede ser que no tenga la capacidad de reconocer y tolerar estas proteínas de la dieta. El resultado es que el bebé, el niño o el animal joven trata la proteína de la dieta como una sustancia extraña y desarrolla una respuesta alérgica a ella. Las alergias alimentarias pueden afectar no solamente a humanos, sino también a otros mamíferos como perros y gatos.

20 La hipersensibilidad alimentaria suele aparecer justo después de que un bebé, niño o animal joven susceptible se topa con un nuevo alimento. Las primeras proteínas de la dieta que se encuentran los bebés son, al menos, las de la leche de vaca y, como se ha dicho arriba, la alergia a la leche de vaca es la más común de las alergias alimentarias. En general se admite que los bebés con alergia comprobada a la leche de vaca tienen mayor riesgo de desarrollar alergias a otras proteínas de la dieta, como las de huevo y cereales, pero incluso los bebés que han desarrollado con éxito una tolerancia oral a las proteínas de la leche de vaca pueden desarrollar subsiguientemente alergias a otras proteínas de la dieta, como las de huevo y cereales, cuando éstas se introducen en la dieta tras el destete.

25 Desde un punto de vista dietético hay dos maneras de tratar una alergia establecida: evitar totalmente los alimentos que contienen el alérgeno o tratarlos para eliminar su potencial alérgeno, por ejemplo mediante hidrólisis extensa. Con este último propósito se elaboran fórmulas infantiles que contienen proteínas de leche de vaca extensamente hidrolizadas (péptidos formados por no más de cinco aminoácidos).

30 Para ayudar a reducir el riesgo de desarrollar alergia a la leche de vaca, en particular para los niños considerados en riesgo de padecerla (es decir, para los niños que tienen al menos un pariente cercano que sufre una alergia) se han propuesto fórmulas infantiles con proteínas de leche de vaca menos extensamente hidrolizadas. Estos productos suelen describirse como hipoalérgicos, término definido en la directiva europea 96/4/EC y en el contexto de la leche como un producto que contiene proteínas hidrolizadas cuya alergenicidad es al menos 100 veces inferior a la de las proteínas no hidrolizadas. En la patente US nº 5,039,532 se describe un proceso para producir proteínas de leche de vaca hipoalérgicas.

40 Para reducir la alergenicidad de las proteínas de leche de vaca se han propuesto muchos otros procedimientos, pero en comparación con éstas se ha prestado relativamente poca atención a otras proteínas de la dieta, como las de huevo, que a menudo provocan reacciones alérgicas. Los huevos son una fuente excelente de proteínas de gran calidad, que constituyen normalmente un 12% en peso de la parte comestible del huevo. Además de consumirse en su estado natural, por ejemplo hervidos o pochados o en forma de tortilla, los huevos también se utilizan a menudo como ingredientes en otros productos alimenticios para fines nutricionales y funcionales. Por ejemplo, los huevos se pueden emplear como agentes colorantes y aglutinantes en platos tales como pasta y como agentes espesantes y gelificantes en platos tales como pudines, quiches y salsas.

50 Sin embargo la proteína de huevo, en concreto la ovoalbúmina, se ha relacionado con el desarrollo de una alergia. De hecho la reducción de la alergenicidad de las proteínas del huevo sería aún más necesaria que la reducción de la alergenicidad de las proteínas de la leche de vaca, ya que la alergia a las proteínas de la leche de vaca desaparece normalmente de manera espontánea a una edad entre dos y cinco años, mientras que la alergia a las proteínas de huevo tarda generalmente más en desaparecer e incluso puede persistir durante toda la vida. Por tanto un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para producir proteínas de huevo hipoalérgicas, así como nuevos productos alimenticios que contengan proteínas de huevo hidrolizadas.

55 La patente JP 03-280835A revela la preparación de hidrolizados de clara de huevo que tienen una excelente acción inhibidora del enzima convertidor de angiotensina.

La patente WO 2006009448 proporciona un hidrolizado de proteína con propiedades antihipertensivas.

60 El documento DD281540 aporta información sobre fracciones proteicas de huevo que tienen menor alergenicidad.

Resumen de la presente invención

65 En este sentido la presente invención proporciona un proceso para producir proteínas de huevo enzimáticamente hidrolizadas, con un grado de hidrólisis entre el 20 y el 25%, que comprende una primera etapa de hidrólisis en la

5 cual las proteínas de huevo intactas se hidrolizan enzimáticamente mediante una primera proteasa, una etapa intermedia de calentamiento en la cual el producto de la primera hidrólisis se calienta a una temperatura no mayor de 75°C, una segunda etapa de hidrólisis en la cual el producto de la etapa intermedia de calentamiento se hidroliza enzimáticamente mediante una segunda proteasa y una etapa de inactivación en la cual el producto de la segunda hidrólisis se calienta a una temperatura comprendida entre 85 y 90°C y se mantiene a esta temperatura durante al menos 30 minutos, seleccionando la primera y la segunda proteasa como se indica en la reivindicación 1.

Descripción breve de las figuras

10 La figura 1 muestra la alergenicidad residual específica de OVA de hidrolizados de huevo.
La figura 2 muestra la alergenicidad reducida en un ensayo funcional de activación de mastocitos.

Descripción detallada de la presente invención

15 En esta exposición los siguientes términos tienen los siguientes significados:

“grado de hidrólisis” o “GH” de una proteína se refiere a la cantidad de nitrógeno en grupos NH₂ libres dividida por la cantidad total de nitrógeno (grupos NH y NH₂), expresado en porcentaje;

20 “huevo entero hidrolizado” significa huevo íntegro cuyas proteínas han sido hidrolizadas parcialmente;
“huevo entero hidrolizado hipoalérgico” significa huevo íntegro hidrolizado cuyas proteínas hidrolizadas tienen una alergenicidad al menos 100 veces menor que la de las proteínas de huevo no hidrolizadas;
“proteínas de huevo hipoalérgicas” significa que su alergenicidad es al menos 100 veces inferior a la de las proteínas de huevo no hidrolizadas.

25 Todas las referencias a porcentajes son en peso, a no ser que se exprese de otra manera.

La primera proteasa se elige del grupo formado por proteasas bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* y mezclas de ellas, tripsina y pancreatina.

30 La segunda proteasa se elige del grupo formado por proteasas bacterianas de *Bacillus licheniformis*, proteasas fúngicas de *Aspergillus oryzae*, tripsina y pancreatina.

35 Un ejemplo de proteasa bacteriana de *Bacillus amyloliquefaciens* es el enzima que se vende con la marca comercial Neutrase®. La proteasa bacteriana de *Bacillus licheniformis* se llama subtilisina y un enzima de este tipo se vende con la marca comercial Alcalase®. Un ejemplo de mezcla de proteasas bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* es la mezcla enzimática que se vende con la marca comercial Protamex®. Un ejemplo de proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* es el enzima que se vende con la marca comercial Flavourzyme®. Como bien saben los especialistas en la materia la pancreatina es una mezcla de tripsina y quimotripsina que se puede obtener a partir de páncreas porcino y la propia tripsina puede obtenerse de la pancreatina, entre otras.

40 Una combinación especialmente preferida de primera y segunda proteasa son las proteasas bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* como primera proteasa y una proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* como segunda proteasa.

45 El material de partida para el proceso de la presente invención son proteínas de huevo intactas en cualquier forma líquida apropiada. Como ejemplo de material de partida adecuado cabe citar el huevo entero líquido pasteurizado. El proceso de la presente invención puede incluir una etapa adicional de precalentamiento antes de la primera etapa de hidrólisis. El precalentamiento se puede efectuar a una temperatura no superior a 65°C durante un periodo de 2 a 15 minutos.

50 La temperatura a la cual se realiza la primera y la segunda etapa de hidrólisis y la duración de estas etapas, así como las cantidades de primera y segunda proteasa que deben emplearse las elegirá el especialista en la materia basándose en el grado de hidrólisis deseado del producto final y en las propiedades de las proteasas seleccionadas, como es bien sabido del estado técnico. No obstante, como regla general, cuanto mayor sea el grado de hidrólisis requerido, más fuerte(s) debe(n) ser la(s) proteasa(s), mayor la duración de la hidrólisis y mayor la concentración de proteasa empleada. Por ejemplo, para obtener un hidrolizado con un GH comprendido entre 20 y 25% de acuerdo con la reivindicación 1, se podría emplear un 2 hasta un 10% de enzima (referido al peso del material de partida por hidrolizar) en cada etapa de hidrólisis y cada una de ellas duraría unas dos horas. Las combinaciones concretas de enzimas pueden incluir las siguientes (el nombre comercial de los ejemplos de enzimas de origen bacteriano y fúngico se usa solamente por motivos de concisión):

| | | |
|----|------------------|------------------|
| 65 | Primera proteasa | Segunda proteasa |
| | Protamex 5% | Flavourzyme 5% |
| | Protamex 2% | Flavourzyme 2% |
| | Alcalasa 10% | Alcalasa 10% |
| | Alcalasa 5% | Alcalasa 5% |

| | |
|------------------|----------------|
| Alcalasa 5-10% | Protamex 5% |
| Alcalasa 5-10% | Flavourzyme 5% |
| Neutrasa 5-10% | Protamex 5% |
| Neutrasa 5-10% | Flavourzyme 5% |
| Tripsina 1-5% | Protamex 5% |
| Tripsina 1-5% | Flavourzyme 5% |
| Pancreatina 1-5% | Protamex 5% |
| Pancreatina 1-5% | Flavourzyme 5% |

5
10 Asimismo la temperatura a la cual tienen lugar las etapas de hidrólisis se elegirá teniendo en cuenta que sea la temperatura óptima para la actividad enzimática de las proteasas empleadas, la cual es específica del enzima. El productor del enzima proporcionará la orientación adecuada para ello.

15 El sabor amargo puede ser el problema de algunos hidrolizados proteicos y los presentes inventores han visto que ciertas proteasas y combinaciones de proteasas dan particularmente buen resultado a este respecto. Es por esta razón que se prefiere especialmente una combinación de una proteasa bacteriana de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* como primera proteasa y una proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* como segunda proteasa. Además se ha comprobado que mediante el uso de estos dos enzimas se puede producir un hidrolizado con una combinación especialmente buena de características organolépticas y menor alergenicidad, partiendo la adición de la segunda proteasa de tal modo que entre el 10 y el 60% de la misma se incorpore durante la etapa intermedia de calentamiento y el resto una vez completada dicha etapa.

20
25 Se ha visto que las proteínas de huevo hidrolizadas producidas mediante el proceso de la presente invención tienen una alergenicidad reducida por un factor de al menos 100, en comparación con las proteínas de huevo intactas, al medirla según la técnica descrita por Fritsché y otros (Int. Arch. Aller and Appl Imm., 93, 289-293, 1990). Por tanto estas proteínas de huevo hidrolizadas y el huevo entero hidrolizado que las contiene se pueden describir como hipoalérgicos.

30 El huevo entero hidrolizado hipoalérgico producido mediante el proceso de la presente invención está en forma de un líquido homogéneo. Se puede usar como tal o se puede secar por métodos conocidos del estado técnico, tales como el secado a rodillo, el secado por pulverización o la liofilización, a fin de producir un polvo homogéneo que es estable al almacenamiento y se puede conservar hasta que se necesite. Al reconstituir el polvo en agua se forma de nuevo un líquido homogéneo.

35 El huevo entero hidrolizado se puede usar en lugar de huevo íntegro en cualquier producto alimenticio al que suele añadirse huevo entero. Por ejemplo, se puede usar huevo entero hidrolizado, en polvo o líquido, reemplazando el huevo íntegro en recetas tales como natillas, quiches, flanes, pasteles, galletas y pudines como el de arroz. El huevo entero hidrolizado también se puede usar para preparar platos como tortillas y revoltillos, después de reconstituirlo con agua, si es preciso. El huevo entero hidrolizado hipoalérgico es un ingrediente especialmente apropiado para alimentos de bebés y niños pequeños, sobre todo en las primeras fases del destete. El huevo entero hidrolizado se puede usar igualmente para preparar estos productos.

40
45 Como se ha señalado arriba, los alérgicos a las proteínas de la dieta no son solo humanos; el huevo hidrolizado producido mediante el proceso de la presente invención también se puede emplear en la elaboración de productos alimenticios para animales, sobre todo para animales de compañía como perros y gatos. Por lo tanto el hidrolizado también se puede usar para reemplazar el huevo íntegro en productos alimenticios destinados al destete de perritos y gatitos, por ejemplo.

50 Seguidamente la presente invención se explica con mayor detalle, haciendo referencia a los siguientes ejemplos:

Preparación de hidrolizados de huevo

55 El material de partida fue huevo entero líquido pasteurizado, FT/OVO/0105 R, de ABCD S.A., Avicole Bretonne Cecab Distribution (Ploërmel, Francia).

Ejemplo 1

60 Se calentaron 30 kg de huevo entero líquido a 65°C durante 10 minutos, agitando a 250 rpm. Después de enfriar a 55°C se añadió un 2% de enzimas Protamex® (lote PW2A1006, de NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y la mezcla se mantuvo a 55°C durante 2 horas. Tras esta primera etapa de hidrólisis se añadió un 1% de enzimas Flavourzyme® 1000 L (lote 400904, de NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y la mezcla se calentó 10 minutos a 75°C. Luego se enfrió la mezcla a 55°C, se agregó de nuevo un 1% de enzimas Flavourzyme® y la mezcla se mantuvo a 55°C durante 2 horas. Tras esta segunda etapa de hidrólisis la mezcla se calentó a 90°C durante 30 minutos y luego se secó por pulverización, obteniéndose un hidrolizado de huevo en polvo que se acondicionó en una bolsa de aluminio.

65

Ejemplo 2

Se calentaron 35 kg de huevo entero líquido a 65°C durante 10 minutos, agitando a 250 rpm. Después de enfriar a 55°C se añadió un 5% de enzimas Protamex® (lote PW2A1006, de NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y la mezcla se mantuvo a 55°C durante 2 horas. Tras esta primera etapa de hidrólisis se añadió un 1% de enzimas Flavourzyme® 1000 L (lote 400904, de NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y la mezcla se calentó 10 minutos a 75°C. Luego se enfrió la mezcla a 55°C, se agregó un 4% más de enzimas Flavourzyme® y la mezcla se mantuvo a 55°C durante 2 horas. Tras esta segunda etapa de hidrólisis la mezcla se calentó a 90°C durante 30 minutos y luego se secó por pulverización, obteniéndose un hidrolizado de huevo en polvo que se acondicionó en una bolsa de aluminio.

Ejemplo 3

Se calentaron 30 kg de huevo entero líquido a 65°C durante 10 minutos, agitando a 250 rpm. Después de enfriar a 55°C se añadió un 10% de enzimas Alcalase® 2.4L (lote 500357, de NOVOZYMES A/S Bagsvaerd, Dinamarca) y la mezcla se mantuvo a 55°C durante 2 horas. Tras esta primera etapa de hidrólisis la mezcla se calentó 10 minutos a 75°C. Luego la mezcla se enfrió a 55°C, se añadió de nuevo un 10% de enzimas Alcalase® y la mezcla se mantuvo a 55°C durante 2 horas. Tras esta segunda etapa de hidrólisis la mezcla se calentó a 90°C durante 30 minutos y luego se secó por pulverización, obteniéndose un hidrolizado de huevo en polvo que se acondicionó en una bolsa de aluminio.

El contenido total de nitrógeno de los hidrolizados se determinó mediante el procedimiento de Dumas (método Carlo Erba). El grado de hidrólisis se midió mediante el método TNBS según (J. Agric. Food. Chem. 1979, 27: 1256-1262). Para el hidrolizado del ejemplo 1 se encontró un GH del 20%, el hidrolizado del ejemplo 2 dio un GH del 23% y el hidrolizado del ejemplo 3 un GH del 25%.

Antigenicidad residual de los hidrolizados de huevo

La antigenicidad residual de la proteína ovoalbúmina (OVA) en los hidrolizados de los ejemplos 1, 2 y 3 se determinó por ELISA de inhibición con un antisuero policlonal de conejo anti-proteína OVA. Se recubrieron pocillos de placas de microvaloración con 100 µl de OVA a 50 µg/ml en de tampón carbonato-bicarbonato y se incubaron a 4°C durante 24 horas. Las placas se lavaron 4 veces en un tampón de PBS-Tween y los sitios reactivos libres se bloquearon añadiendo 200 µl/pocillo de gelatina de pescado (al 0,5% en PBS-Tween). Las placas se incubaron a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora y se lavaron de nuevo 4 veces en tampón de PBS-Tween.

En tubos separados se incubó durante 1 hora a TA 1 parte de una preparación estándar de OVA o de una muestra de ensayo con 1 parte de anticuerpo de conejo anti-proteína OVA (diluido 1:20.000). Después de la incubación se añaden 100 µl de esta mezcla inhibidora a los pocillos de microvaloración anteriormente recubiertos y bloqueados y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron 4 veces en un tampón de PBS-Tween. Luego se añadió un conjugado marcado con peroxidasa de cabra anti-conejo (0,1 ml de una dilución 1:2000) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavaron 4 veces en un tampón de PBS-Tween. Se agregó el substrato cromogénico (0,1 ml de o-fenilendiamina). Tras 15 minutos de incubación se leyó la densidad óptica a 492 nm en un lector de placas de ELISA.

Los resultados están representados en la figura 1, en la cual puede verse que la antigenicidad específica de la OVA de los hidrolizados de los ejemplos de 1 a 3 se redujo por un factor mayor de 10.000 en comparación con la proteína de huevo intacto.

Alergenicidad residual de los hidrolizados de huevo

Para determinar la alergenidad dependiente de la IgE de una molécula antigénica (OVA) se llevó a cabo un ensayo funcional *in vitro* de liberación de serotonina tritiada procedente de mastocitos de rata sensibilizados, de acuerdo con el método anteriormente descrito (Fritsché y otros, J. Allergy Clin. Immunol, vol. 100, nº 2, páginas 266-273). En resumen, los mastocitos se obtuvieron de ratas Sprague-Dawley normales por lavados peritoneales con un medio de Eagle modificado por Dulbecco que contenía un 10% de suero fetal bovino. Las células se lavaron en este medio y se mantuvieron a 4°C durante la noche. Tras dos lavados en tampón de fosfato-HEPES-gelatina de pescado (PHG) de pH 7, 0 las células se resuspendieron en el mismo tampón a razón de 5×10^5 células/ml y se diluyeron con un volumen de suero de rata rico en anticuerpos IgE anti-OVA que contenía 5 µCi/ml de serotonina H³. Después de incubarse a 37°C durante 2 horas las células se lavaron de nuevo tres veces en PHG y se resuspendieron otra vez en PHG a razón de $2,5 \times 10^5$ células/ml. Los mastocitos sensibilizados se distribuyeron en placas de microvaloración (0,1 ml/pocillo) y se mezclaron con 0,05 ml de diluciones en serie de proteína de huevo hidrolizada, producida según el ejemplo 2 (1/10 partiendo de 10 mg/ml). La mezcla se incubó a 37°C durante 60 minutos y se centrifugó. Se mezcló un alícuota (0,05 ml) del líquido sobrenadante con 2 ml de líquido de centelleo y se midió la liberación de H³ con un contador β de Packard.

Los resultados se muestran en la figura 2, en la cual puede verse que el huevo hidrolizado tenía una alergenidad mucho menor (equivalente a 25 µg de OVA/g de proteína) y que este bajo valor se mantenía al incorporar el huevo hidrolizado a un postre tipo flan.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir proteínas de huevo hipoalérgicas - enzimáticamente hidrolizadas - con un grado de hidrólisis comprendido entre el 20 y el 25%, que comprende una primera etapa de hidrólisis en la cual las proteínas de huevo intactas se hidrolizan enzimáticamente con una primera proteasa, una etapa intermedia de calentamiento en la cual el producto de la primera hidrólisis se calienta a una temperatura no mayor de 75°C, una segunda etapa de hidrólisis en la cual el producto de la etapa intermedia de calentamiento se hidroliza enzimáticamente con una segunda proteasa y una etapa de inactivación en la cual el producto de la segunda hidrólisis se calienta a una temperatura comprendida entre 85 y 90°C y se mantiene a esta temperatura durante al menos 30 minutos, seleccionando la primera proteasa del grupo formado por proteasas bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* y mezclas de ellas, tripsina y pancreatina, y la segunda proteasa del grupo formado por proteasas bacterianas de *Bacillus licheniformis*, proteasas fúngicas de *Aspergillus oryzae*, tripsina y pancreatina.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el cual la primera proteasa es una mezcla de proteasas bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* y la segunda proteasa es una proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae*.
3. Proceso según la reivindicación 2, en el cual un 10 hasta un 60% de la proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* se añade durante la etapa intermedia de calentamiento y el resto de proteasa fúngica de *Aspergillus oryzae* se agrega una vez completada la etapa intermedia de calentamiento.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, el cual incluye una etapa adicional de calentamiento previo de las proteínas de huevos intactas a una temperatura no superior a 65°C, durante un periodo de 2 a 15 minutos antes de la primera etapa de hidrólisis.

Figura 1

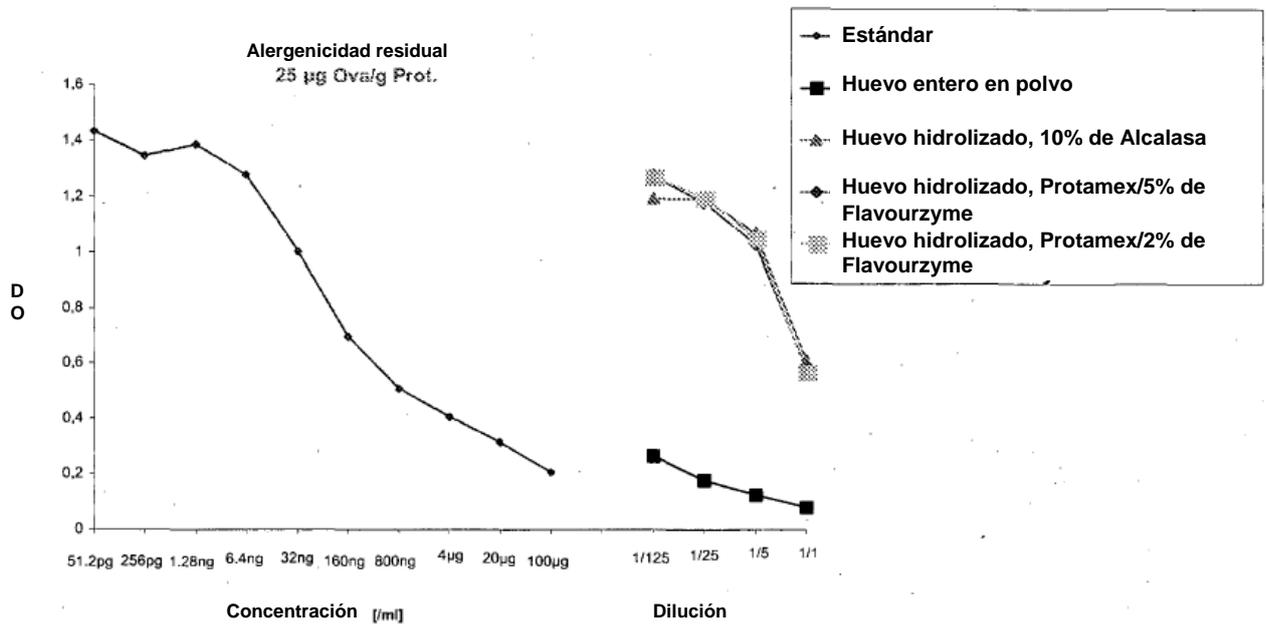


Figura 2

