(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 542 529**

(51) Int. CI.:

A61K 38/40 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2009 E 09766865 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 2300047**

(54) Título: **Composición acuosa de lactoferrina estable térmicamente y su preparación y uso**

(30) Prioridad:

16.06.2008 EP 08158354

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.08.2015

(73) Titular/es:

CAMPINA NEDERLAND HOLDING B.V. (100.0%)
Hogeweg 9
5301 LB Zaltbommel, NL

(72) Inventor/es:

CAO, LINQIU y
MAAS, HANS

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

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

Composición acuosa de lactoferrina estable térmicamente y su preparación y uso

Campo de la invención

[0001] La presente invención pertenece a un método para calentar lactoferrina sin que pierda actividades fisiológicas, y alargar su tiempo de almacenamiento en formulaciones líquidas. Más particularmente, la presente invención se refiere a un método para calentar lactoferrina en condiciones ácidas hasta llegar a una temperatura superior a 60 °C. La invención también pertenece al uso de la lactoferrina así tratada.

Antecedentes de la invención

[0002] La lactoferrina es conocida como una proteína enlazante de hierro distribuida en lágrima, saliva, sangre periférica, leche y similares. Se ha conocido que la lactoferrina tiene diferentes actividades fisiológicas, por ejemplo, actividad antibacteriana contra bacterias nocivas, actividad para promover la absorción de hierro en el intestino, actividad anti-inflamatoria, etcétera. Una revisión de la utilidad de lactoferrina se da en el documento US-A-2007/161541.

[0003] Por lo tanto es deseable la adición de lactoferrina a alimentos, alimentos procesados, medicinas, cosméticos y similares o la ingesta directa como suplemento. Estos productos generalmente necesitan ser tratados térmicamente, por ejemplo pasteurizados o esterilizados, para hacerlos seguros a nivel microbiano y estables en el almacenamiento durante más tiempo.

[0004] No obstante, si no se toma ninguna de las medidas, la lactoferrina se mostrará inestable térmicamente, y el tratamiento térmico de la lactoferrina puede suponer la desnaturalización de la lactoferrina a pH fisiológico. Se dice en la técnica que las actividades fisiológicas de la lactoferrina casi se pierden al calentarla a 62,5°C durante 30 minutos, y la desnaturalización completa se produce al calentarla a 70°C durante 15 minutos.

[0005] Como queda claro anteriormente, el tratamiento térmico suficiente podría no aplicarse a la lactoferrina como ingrediente para la utilización de sus actividades fisiológicas. Se tiene que someter a esterilización a una formulación líquida o una solución madre de lactoferrina, para obtener un tiempo de almacenamiento mayor (varias semanas o meses antes del consumo).

[0006] Ambos documentos EP 454,084 y EP 1,040,766 divulgan bebidas de lactoferrina enriquecidas con hierro. La fortificación con hierro es necesaria para personas con un cambio anémico, mujeres embarazadas o madres nodriza.

[0007] Aunque puede no ser mencionado explícitamente en ellos, el experto en la materia reconoce inmediatamente el efecto de la saturación de hierro en la recuperación de la lactoferrina que se pretende en los EP'084 y EP'766. Según Brisson et al. "Effect of iron saturation on the recovery of lactoferrin in rennet whey coming from heat-treated skim milk" J. Dairy Sci. 90: 2655-2664, la lactoferrina se asocia con hierro, este complejo mejora su termoestabilidad. No obstante, el uso de hierro en campos nutricionales no es deseable frecuentemente, por ejemplo desde el punto de vista del sabor. Además, el complejo de hierro puede añadir estabilidad de la lactoferrina, pero la desnaturalización aún puede ocurrir conforme pasa el tiempo. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos adicionales y mejorados para conseguir la estabilización térmica.

[0008] El documento GB 2,361,703 divulga la estabilización de la vitamina B12 y/o ácido fólico mediante la asociación de éstos con lactoferrina, aumentando así el tiempo de conservación del ácido fólico y vitamina B12, de lo contrario muestran calor y estabilidad de almacenamiento bajos en presencia de oxígeno. La lactoferrina se usa de cualquier fuente, incluyendo lactoferrinas estabilizadas con hierro. No obstante, si se mira desde una perspectiva diferente, es decir buscando maneras de estabilizar lactoferrina, la solución para enlazarla a ácido fólico y vitamina B12 para su uso en productos alimenticios es indeseable. Estos compuestos son costosos, interfieren en todo tipo de vías metabólicas; relacionado con ello, la administración de estos compuestos a la gente no es ilimitada.

[0009] Para dirigir su estabilidad al calor, en el documento EP-A-437,958, a nombre de Morinaga Milk Industry, se sugiere calentar lactoferrina a una temperatura superior a 60°C a un pH entre 1,0 - 6,5. De los resultados de la cromatografía en fase líquida enumerados en la tabla 1, se concluye que la lactoferrina es estable cuando se calienta durante 5 minutos a 60 °C bajo condiciones ácidas. La misma tabla también muestra que la ventana de éxito se restringe espectacularmente cuando se aumenta la temperatura a 70, 80, 90 o incluso 100 °C. Por encima de 100 °C, toda lactoferrina se desnaturaliza. Todas las mediciones se toman poco después del tratamiento térmico. El documento EP-A-437,958 no se pronuncia en cuanto a la estabilidad de la lactoferrina en el tiempo y temperatura de almacenamiento.

[0010] En un intento de reproducir los resultados proporcionados en el documento EP-A-437,958, los inventores descubrieron que la HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento por sus siglas en inglés) es de hecho inapropiada para determinar el grado de desnaturalización. Se ha descubierto que una mejor técnica implica la FPLC

(cromatografía líquida de rendimiento rápido por sus siglas en inglés) y/o ELISA, y que la HPLC sobreestima fácilmente el grado de "desnaturalización". Por lo tanto, los resultados en la tabla 1 del documento EP-A-437,958 en realidad no son tan buenos como se reivindica. Además, se ha descubierto que la lactoferrina termoestable en el documento EP-A-437,958, si se llega a conseguir, duró poco tiempo. La desnaturalización aún ocurría durante semanas bajo un tiempo de almacenamiento prolongado bajo ciertas temperaturas. El documento EP-A-437,958 mismo no se pronuncia en cuanto al efecto del tratamiento térmico sobre la tiempo de almacenamiento. Además, el éxito limitado del método defendido por Morinaga disminuye espectacularmente cuando se alargan los tiempos de calentamiento. De hecho esto se reconoce en la patente nombrada misma. Las observaciones en este párrafo se basan en los ejemplos comparativos que anexos a la presente invención. Finalmente, los presentes inventores observaron que el método del documento EP-A-437,958 produce lactoferrina acuosa que contiene composiciones que son sólo estables durante periodos de tiempo más largos si se mantienen a 7° C o menos, así que necesitan un sistema de refrigeración.

[0011] En conclusión, la presunta estabilidad térmica de la lactoferrina mediante el tratamiento térmico en condiciones ácidas conforme al documento EP-A-437,958 es bastante limitada, ya que las líneas de producto en la práctica implican frecuentemente combinaciones más severas de tiempo y temperatura de calentamiento, en la pasteurización. Frecuentemente se usa agua en ebullición, y especialmente en los tiempos de calentamiento de producción en lote se puede alargar fácilmente. Además, si esto debe requerirse para mantener la composición de lactoferrina acuosa estable durante más tiempo, por ejemplo meses, implica sistemas de refrigeración costosos y difíciles de operar logísticamente. Muchas aplicaciones o formulaciones nutricionales que contienen lactoferrina deberían tener un tiempo de almacenamiento de semanas, incluso meses. El método anterior no puede cumplir esta condición.

[0012] Los inventores de la presente invención se han esforzado para desarrollar un método mejorado para calentar lactoferrina sin perder sus actividades fisiológicas, y dando como resultado una lactoferrina tratada térmicamente que permanece estable durante periodos de tiempo alargados, incluyendo temperaturas de almacenamiento por encima de 7°C. Además, los inventores querían evitar restringirse a asociar lactoferrina con hierro o compuestos tales como vitamina B12 y ácido fólico.

Resumen de la invención

[0013] Es objeto de la presente invención proporcionar un método para el tratamiento térmico de lactoferrina (LF) sin que pierda actividades fisiológicas, tales como actividad antibacteriana, actividad enlazante de hierro, antigenicidad. Tal método de estabilización térmica debería mantenerse durante tiempos de calentamiento alargados y a temperaturas altas, y la lactoferrina resultante debería permanecer estable durante tiempos alargdos, en términos de semanas o incluso meses.

[0014] Es también objeto proporcionar un método para calentar lactoferrina que produce la estabilización térmica de la lactoferrina en el almacenamiento durante periodos alargados a temperaturas más altas, por encima de 7 °C.

[0015] Se ha descubierto que estos objetos se consiguen si la lactoferrina se calienta bajo condiciones ácidas en presencia de grandes cantidades de carbohidrato hidrofílico o estabilizadores de poliol. El alto nivel de estabilizadores causa que la lactoferrina sea estable en solución ácida durante un periodo de tiempo muy largo, al menos dos semanas, preferiblemente al menos cuatro semanas, dependiendo de la temperatura de almacenamiento y del pH de la solución. El paso de calentamiento destruye proteasas residuales que de lo contrario causarían la degradación de la lactoferrina durante el almacenamiento.

[0016] La interacción exitosa entre la lactoferrina y azúcares a altas temperaturas se restringe a un pH superior a 2, e inferior a 5. A pH bajo, entra en juego la degradación o hidrólisis ácida de la lactoferrina, como se puede demostrar con la FPLC. En el límite de pH superior, la estabilización térmica permanece detrás y la reacción de Maillard, inducida por las cantidades significativas de azúcares presentes, comienza a interferir.

[0017] Aunque los ejemplos del documento EP-A-437,958 divulgan azúcares que están presentes durante el tratamiento térmico, claramente éstos no son parte de esa invención. Los azúcares están meramente presentes como un ingrediente alimentario adicional, por ejemplo zumo de naranja. Como se demuestra en los ejemplos anexos, a los niveles bajos presentados en el documento EP-A-437,958, no se pudo observar ningún efecto de los azúcares. De hecho, el ejemplo 5 del documento EP-A-437,958 divulga un gel, y no una formulación líquida conforme a la presente invención. Los efectos de inestabilidades son menos pronunciados en estos casos. Ahora se descubre que una cantidad de estabilizador de carbohidrato o poliol, es decir azúcares superiores al 30% en peso, es esencial para estabilizar térmicamente la lactoferrina en formulaciones líquidas.

[0018] De esta manera, los inventores han permitido que sea posible proporcionar formulaciones que contienen LF líquidas esterilizadas que son estables en el almacenamiento. Hasta ahora, las soluciones que contienen LF habían sufrido de estabilidad de almacenamiento baja. La alternativa comercial restante fue proporcionar LF en forma de polvos secados por atomización. Ventajosamente, la producción de composiciones de LF líquidas esterilizadas estables en el almacenamiento ahora disponibles requiere menos energía (evaporación de solvente redundante).

Además, la forma esterilizada produce la adición aséptica simple para varias formulaciones, por ejemplo fórmulas infantiles, dentro del alcance. La formulación líquida puede usarse directamente en formulaciones finales, sin necesidad de disolución.

Descripción detallada de la invención

[0019] La invención pertenece así a una composición acuosa que contiene lactoferrina, el 35 - 70% en peso de estabilizadores de carbohidrato y/o poliol, en base al peso total de la composición acuosa, dicha composición muestra un pH superior a 2, inferior a 5. En estas condiciones, la composición acuosa y la lactoferrina contenida en ésta se pueden someter a un tratamiento térmico sin afectar significativamente la actividad fisiológica de la lactoferrina. La invención pertenece así particularmente a la composición acuosa anterior, siendo tratada térmicamente, conteniendo así lactoferrina estabilizada térmicamente. De esta manera, la lactoferrina estabilizada térmicamente se provee sin necesidad de asociación.

[0020] En otro aspecto, la invención pertenece a un método de preparación de una composición que contiene lactoferrina estabilizada térmicamente según la presente invención, a) proporcionando una composición acuosa que contiene lactoferrina, 35 - 70% en peso de estabilizadores de carbohidrato y/o poliol, en base al peso total de la composición acuosa, dicha composición exhibe un pH superior a 2, inferior a 5, y b) sometiendo dicha composición acuosa a un tratamiento térmico, preferiblemente a una temperatura de al menos 60°C.

[0021] En otro aspecto, la invención pertenece al uso de la composición acuosa con lactoferrina estabilizada térmicamente en alimentos (saludables), comida para animales, suplementos nutricionales, cosméticos, medicinas, y a tales alimentos (saludables), comida para animales, suplementos nutricionales, cosméticos y productos médicos con lactoferrina estabilizada térmicamente. La lactoferrina de la presente invención encuentra un uso particular en fórmulas infantiles, nutrición médica, alimentos deportivos, alimentos saludables y suplementos, por ejemplo en bebidas, yogur y bebidas de yogur. Además, la solución que contiene LF y azúcar también puede usarse como un suplemento sin ningún otro tratamiento diferente del tratamiento térmico debatido anteriormente.

[0022] La lactoferrina estabilizada térmicamente se distingue claramente de la lactoferrina tratada térmicamente disponible comercialmente en su estabilidad a largo plazo a temperaturas elevadas, es decir por encima de 7 °C. Por lo tanto, con "estabilizada térmicamente" en el contexto de la invención se hace referencia a que las propiedades fisiológicas, por ejemplo la actividad enlazante de hierro, de la lactoferrina tratada térmicamente permanecen significativamente invariadas si la composición ácida que contiene dicha lactoferrina se almacena en condiciones de almacenamiento normales, es decir entre 7- 25°C, preferiblemente más de 7°C, durante un periodo de dos semanas, de forma más preferible tres semanas, de la forma más preferible cuatro semanas. Los cambios en las propiedades fisiológicas se monitorean en cuanto al grado de desnaturalización, usando FPLC y/o ELISA, y la capacidad enlazante de hierro, por ejemplo como se detalla en los ejemplos. Para formas adecuadas de ejecutar FPLC, ELISA y mediciones enlazantes de hierro, el experto en la materia se refiere a las citas dadas posteriormente de las tablas 3 y 4. Allí, también se muestra que tanto la FPLC como el ELISA son técnicas adecuadas para estudiar el contenido de LF, y los cambios en ésta. Los cambios en el grado de desnaturalización inferiores al 5% se consideran insignificantes, es más, se encuentran dentro del error experimental. Nótese que la estabilidad de la lactoferrina tratada térmicamente conforme a la presente invención no se restringe a los intervalos de tiempo dados anteriormente, pero se alarga fácilmente hasta meses (véanse los ejemplos). No obstante, los intervalos anteriores relativamente cortos son suficientes para distinguir la lactoferrina tratada térmicamente de la presente invención de aquéllos disponibles comercialmente, por ejemplo como los proporcionados en el documento EP-A-437,958. La composición tratada térmicamente es preferiblemente una composición esterilizada térmicamente, por ejemplo una composición procesada con UHT. En otra forma de realización, la composición se hierve, es decir se trata a 100 °C.

[0023] La palabra "lactoferrina" usada por la presente incluye lactoferrina (LF) derivada de cualquier y todas las fuentes de lactoferrina tales como leche mamífera (por ejemplo, leche humana al igual que leche de vaca, de oveja, de cabra, leche de caballo, leche de caprino, leche de camello y similares) en cualquier fase de lactancia (por ejemplo, calostro, leche transicional, leche madurada, leche en lactancia tardía), leche procesada y subproductos en el procesamiento de la leche tales como leche desnatada, suero de leche y similares (de ahora en adelante son referidos en general como leche y similares). Se prefiere usar lactoferrina bovina.

[0024] La palabra "lactoferrina" usada por la presente incluye cualquier y todas las sustancias de lactoferrina tales como lactoferrina recombinante; lactoferrina nativa recién aislada mediante métodos convencionales (por ejemplo, cromatografía de intercambio de iones) de cualquier y todas las fuentes de lactoferrina; apolactoferrina obtenida mediante la eliminación del hierro de la lactoferrina nativa con ácido clorhídrico, ácido cítrico y similares; lactoferrina saturada con metal obtenida mediante la quelación de apolactoferrina con metal tal como hierro, cobre, zinc, manganeso y similares; o mezclas adecuadas de las mismas (de ahora en adelante abreviadas como LF en general).

[0025] Puede ser lactoferrina no purificada, es decir lactoferrina extraída directamente bien de leche o suero de leche u otro medio en el caso de lactoferrina recombinante y no sometida a pasos de purificación adicionales. La lactoferrina pura tiene un peso molecular previsto de 78 kDa. Otros componentes menores de alto o bajo peso

molecular presentes en la composición de lactoferrina indican la fuente de lactoferrina, como se hará evidente para el experto en la materia. En una forma de realización, se aplica lactoferrina nativa, "nativa" se define como > 85% nativa según se mide usando el ELISA.

[0026] El término "lactoferrina estabilizada térmicamente" como se obtiene utilizando el método de la presente invención abarca aquellas formas de realización donde al menos el 90% de la lactoferrrina presente sigue siendo estable, preferiblemente nativa, después del tratamiento térmico, preferiblemente al menos el 95%. Estos números pueden determinarse fácilmente usando ELISA, FPLC como se establece en la especificación.

[0027] Si no queda claro anteriormente, se entiende que el término "estabilizada térmicamente", más bien "estabilización térmica", comprende la estabilización de una LF tratada térmicamente *conforme avanza el tiempo*, más que la estabilización de LF *durante* el tratamiento térmico, que es el significado dado a este término por ejemplo en el documento EP-A-437,958. En la técnica, la LF estable térmicamente a largo plazo es a veces referida como "LF tratada térmicamente estable en almacenamiento". Esta terminología se puede adoptar por la presente.

[0028] No se toma ningún medio para influir la fuerza salina de la lactoferrina. La fuerza iónica en fuentes que proveen lactoferrina corresponde típicamente a un nivel de al menos 0,01 M cuando se disuelve en más del 10% (w/w) de solución de LF. El nivel de sal no se considera un factor crítico, siempre y cuando la fuerza iónica, particularmente durante el tratamiento térmico, sea superior a 0,01 M. A niveles inferiores, podría ocurrir precipitación.

[0029] La cantidad de lactoferrina contenida en la composición acuosa se encuentra preferiblemente en el rango de 0,05 - 20% en peso, en base al peso total de la composición acuosa. La cantidad de lactoferrina es preferiblemente al menos el 0,1, de forma más preferible al menos el 0,5, incluso de forma más preferible al menos el 1% en peso, de la forma más preferible al menos el 2% en peso. La máxima cantidad de lactoferrina es preferiblemente el 18% en peso, de forma más preferible el 15% en peso, incluso de forma más preferible el 10% en peso. La cantidad de lactoferrina se puede ajustar en vistas a su aplicación posterior, como se explicará con más detalle posteriormente.

[0030] Como estabilizador de carbohidrato, se prefiere usar monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos y/o oligosacáridos, que contengan preferiblemente hasta 10 unidades monosacáridas.

[0031] Ejemplos preferidos incluyen dextrosa, fructosa, sacarosa, glucosa, maltosa, trehalosa, inulina u oligofructosa y/o mezclas derivadas, dependiendo del uso. Pueden haber presentes en la composición componentes -o incluso fracciones de los mismos- con longitudes de cadena extendidas, pero no se considera que aquellos que no se encuentren dentro de la definición anterior de un estabilizador de carbohidrato contribuyan a los números de peso según la presente invención. Alternativamente o adicionalmente, como estabilizador de carbohidrato pueden usarse maltodextrinas o jarabes de glucosa. Se prefiere que los DE (equivalentes de dextrosa) del (de los) estabilizador(es) de carbohidrato se encuentre entre 1 y 99, de forma más preferible entre 5 y 99. Fuentes adecuadas de estabilizador de carbohidrato en el contexto de la invención son azúcar invertido, o jarabe de maíz, tal como HFCS (sirope de maíz alto en fructosa por sus siglas en inglés). El azúcar invertido es una mezcla de glucosa y fructosa en proporciones de peso aproximadamente iguales. Se prefiere que el estabilizador de carbohidrato contenga al menos el 45% en peso, preferiblemente al menos el 50% en peso de glucosa y/o fructosa, en base a la cantidad total de estabilizador de carbohidrato presente en la composición. Adicionalmente o alternativamente, se prefiere que el estabilizador de carbohidrato contenga glucosa y fructosa, en cantidades relativas en el rango de 1,5:1 - 1:1,5, preferiblemente 1,2:1 - 1:1,2. En una forma de realización preferida, el azúcar invertido contiene adicionalmente sacarosa. En tal caso, se prefiere que el estabilizador contenga al menos el 65% en peso de glucosa, fructosa y/o sacarosa. En otra forma de realización, el HFCS se usa como fuente de estabilizador de carbohidrato; es preferible que contenga al menos el 40% en peso de fructosa, en base al peso total de estabilizador de carbohidrato.

[0032] Polioles adecuados comprenden manitol, galactitol, inositol, xilitol, sorbitol, glicerol y/o lactitol.

[0033] La cantidad del (de los) estabilizador(es) anteriormente mencionado(s) se encuentra preferiblemente entre el 30 y 70% en peso, de forma más preferible al menos el 35% en peso, de forma más preferible al menos el 40% en peso. La cantidad de estabilizador(es) es preferiblemente inferior al 65% en peso, de forma más preferible inferior al 60% en peso. Estos números se basan en el peso total de la composición acuosa. El efecto de la cantidad de azúcares sobre cantidades inferiores aplicadas accidentalmente en la técnica se demuestra en los ejemplos anexos. Al 15%, e incluso al 30% de azúcares, la lactoferrina no está provista con la estabilidad de tiempo de almacenamiento que se pretende.

[0034] La composición de lactoferrina acuosa es preferiblemente una formulación líquida. El líquido tiene preferiblemente una viscosidad inferior a 3000 mPa·s, de forma más preferible menor que 1000 mPa·s, de forma más preferible menor que 500 mPa·s, como se mide usando p. ej un viscosímetro de rotación (Brookfield) a 20°C. En una forma de realización preferida, la composición por consiguiente excluye geles, donde los problemas de estabilidad son frecuentemente inadvertidos.

[0035] El pH de la composición acuosa se encuentra preferiblemente en el rango de 2,5 - 4,5, de forma más preferible al menos pH 3. El pH de la composición acuosa es de forma más preferible 4 o menos. Un pH alto da lugar a la reacción de Maillard, es decir al desarrollo de decoloración marrón oscuro poco atractiva y/o un sabor amargo.

[0036] Conforme al método de la presente invención, se puede conseguir un ajuste del pH añadiendo ácido inorgánico (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico y similares) y/o ácido orgánico (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, ácido málico y similares). Ciertamente, cuando la composición de por sí tiene un valor de pH dentro del rango descrito, el ajuste del pH es innecesario, no obstante, incluso es preferible ajustar el pH de la composición de la invención al pH óptimo dependiendo de la condición de calentamiento por aplicar (temperatura de calentamiento y tiempo de calentamiento) y el propósito del calentamiento (por ejemplo, esterilización, ebullición y similares).

[0037] El método de preparar la composición con lactoferrina estabilizada térmicamente implica la mezcla de agua, lactoferrina y uno o más de los estabilizadores anteriormente mencionados, y un ajuste del pH opcional. Como fuente de lactoferrina, se puede usar la lactoferrina secada por atomización o liofilizada, o una solución que contiene lactoferrina que esté disponible fácilmente de por ejemplo un proceso de producción de lactoferrina. El orden de mezcla no se considera restrictivo, siempre y cuando todos los pasos hayan sido completados antes del tratamiento térmico. Para mejorar la dispersión de la lactoferrina, puede opcionalmente mezclarse con (al menos parte de) el estabilizador antes de añadir agua y ajustar el pH.

[0038] El tratamiento térmico, que produce la composición tratada térmicamente según la presente invención, implica una temperatura de al menos 60°C, preferiblemente al menos 70°C, preferiblemente al menos 75°C, de forma más preferible 80°C, de la forma más preferible al menos 90°C. Debido a que la composición que contiene lactoferrina de la invención ha demostrado ser estable durante tiempos de calentamiento más largos, el tiempo de calentamiento no se considera particularmente limitado. El tratamiento térmico implica preferiblemente esterilización, por ejemplo tratamiento UHT. El calentamiento se puede realizar en varios tipos de equipamiento, bien en forma de lote o continuamente. Condiciones de calentamiento adecuadas son de 15 - 60 segundos entre 80 y 100°C para el calentamiento continuo; de 5 - 30 minutos entre 70 y 90°C para el calentamiento en lote. Un paso UHT implica preferiblemente el calentamiento entre 135°C y 150°C durante 2 - 35 segundos, y un tratamiento térmico de lote implica preferiblemente calentamiento a 80°C - 100°C durante 5 - 30 minutos.

[0039] En una forma de realización, las condiciones de calentamiento se seleccionan de acuerdo con aquéllas presentadas en el documento WO-A-03/-11040, su contenido se incorpora por la presente por referencia. El tratamiento térmico comprende preferiblemente el calentamiento de la solución que contiene LF a una temperatura de al menos 60°C, preferiblemente al menos 70°C, y menor de 200°C, de forma más preferible menor de 160°C, durante un periodo de tiempo igual a o al menos t, este periodo de calentamiento t se determina mediante la siguiente fórmula:

$$t = (500/(T-59)) - 4,$$

donde t es la duración del calentamiento (en segundos) y T es la temperatura de calentamiento (en °C). De forma más preferible, las condiciones de calentamiento máximas cumplidas se determinan mediante la siguiente fórmula:

$$t = (90000/(T-59))-900,$$

donde t y T tienen el significado mencionado anteriormente.

[0040] El tratamiento térmico implica preferiblemente un periodo de 0,1 segundos a 24 horas. Particularmente se prefiere que el tiempo de calentamiento varíe de 10 s - 1 hora, de forma más preferible a partir de al menos 10 minutos. Las temperaturas correspondientes mínimas y máximas preferidas se pueden calcular con las fórmulas anteriores.

[0041] Se pueden añadir ingredientes adicionales antes o después del paso de calentamiento, dependiendo de su dependencia al calor y/o interacción con la lactoferrina. Los ingredientes que interfieren con la lactoferrina durante el calentamiento se pueden añadir asépticamente después. Ejemplos no limitativos de aditivos son vitaminas, tales como vitamina C, minerales, tampones, péptidos, polisacáridos tales como pectina, a veces aplicados para activar la LF, y aminoácidos, colorantes, aromatizantes, etc.

[0042] Como se ha mencionado anteriormente, la invención también se refiere a un alimento, comida para animales, suplemento nutricional, cosmético o producto farmacéutico que contiene lactoferrina estabilizada térmicamente mediante el método según la invención. La solución se puede añadir asépticamente a un elenco de productos. La lactoferrina está presente típicamente en una cantidad de 0,05 - 10% en peso, de forma más preferible del 0,1 - 5% en peso, en base al peso total. La LF estabilizada térmicamente y estable en el almacenamiento según la presente invención se distingue de la técnica anterior. El tratamiento térmico tradicional en condiciones de pH restringidas (véase por ejemplo el documento EP-A-437,958) no produce una LF estable en el almacenamiento.

[0043] En una forma de realización, el producto es un equipo de partes que comprenden: i) una formulación líquida que comprende la LF estabilizada térmicamente de la presente invención, y ii) una fórmula alimentaria líquida. En fórmulas líquidas, la LF necesita ser separada de otros ingredientes alimenticios para evitar cualquier interacción que pueda suponer la pérdida de la actividad de la LF. Las propiedades de almacenamiento de la LF según la presente invención ahora la hacen accesible para los usuarios finales sin necesidad de otra disolución. Esto es particularmente ventajoso en aplicaciones de fórmulas infantiles (siendo la fórmula alimenticia de ii) una composición de fórmula infantil), por ejemplo si te encuentras en carretera con acceso limitado al agua.

[0044] En una forma de realización, la invención pertenece a un método de tratamiento de acné, que comprende la administración por vía oral de una cantidad eficaz de una formulación líquida que comprende la LF estabilizada térmicamente de la presente invención a una persona que sufre de acné. Se proporcionan más detalles en el documento EP-A 1,833,495, su contenido se incorpora por la presente por referencia. El tratamiento (profiláctico) puede ser cosmético o no cosmético. Personas en riesgo de acné son fácilmente identificables para el experto en la materia. En una forma de realización, las personas en riesgo de o que sufren acné son adolescentes, preferiblemente entre 12 y 20 años de edad.

Ejemplos

En todos los experimentos, la lactoferrina se usó como se obtiene de DMV International, Países Bajos.

Ejemplo 1 - efecto del pH

[0045] El efecto del pH en el tratamiento térmico (95°C durante 45 segundos) de solución de jarabe que contiene LF (1% LF, p/p) en jarabe de azúcar A (46% p/p) se estudió utilizando FPLC (cromatografía líquida de rendimiento rápido por sus siglas en inglés). El jarabe de azúcar A comprende una mezcla de glucosa:fructosa:sacarosa = 1:1:1 en base al peso, con un total de aproximadamente el 70% en peso de fructosa, glucosa y sacarosa. Los resultados se muestran en la tabla 1, obtenidos directamente después del tratamiento térmico.

[0046] Los resultados revelaron que un pH mayor da lugar a la reacción de Maillard, reduciendo así la retención de LF. A pH bajo, puede ocurrir reacción hidrolítica. El pH óptimo es alrededor de 3-3,5.

Tabla 1: retención de LF a pHs diferentes

Muestra	pH	% retención LF	% LF perdido
Muestra 1	2,4	90,3	9,7
Muestra 2	3,4	92,6	7,4
Muestra 3	4,2	84,7	15,3

[0047] Retención de LF: % de LF presente en la muestra, en comparación con la misma muestra antes del tratamiento térmico, medido con el mismo método de análisis.

Ejemplo comparativo I - temperatura de almacenamiento para LF con y sin azúcar

[0048] La estabilidad de almacenamiento del 1% en peso de LF en la solución de jarabe A (46% sólidos) después del tratamiento térmico (95°C durante 45 segundos) se comparó con solución acuosa de LF normal al mismo pH (pH 3,5) a temperaturas de almacenamiento bajas y altas, después del tratamiento térmico a 95°C durante 45 segundos). El tiempo de almacenamiento fue 2 semanas.

[0049] Los resultados se muestran en la tabla 2. Se ha observado que la concentración de LF en el jarabe se mantuvo relativamente constante, mientras que la LF en solución acuosa se descompuso relativamente rápido a una temperatura de almacenamiento mayor. Se concluyó que la presencia de azúcar tiene un efecto de protección.

Tabla 2: estabilidad de almacenamiento de la LF

Muestra	Solución de jarabe de LF (pH 3,5)**	Solución acuosa de LF (pH 3,5)**
t=0*	100%	100%
2 semanas (7 °C)	95%	96,1%
2 semanas (37°C)	91%	48,1%
*Directamente después del tratamiento térmico **pH fue ajustado con ácido cítrico		

Ejemplo 2 - tiempo de almacenamiento

[0050] Se estudió la estabilidad de almacenamiento a largo plazo del 1% en peso de LF en 45% de solución acuosa de glucosa durante un periodo de 4 meses, después de un tratamiento térmico de 90°C durante 5 minutos. La temperatura de almacenamiento fue 7 °C.

[0051] Se descubrió que la concentración de LF permaneció invariada, a un nivel de aproximadamente el 100%.

Ejemplo comparativo II - métodos de análisis (HPLC vs. FPLC) de % de LF sin azúcar

[0052] Se sometió a tratamiento térmico una solución 4% Bovine LF Solution, (DMV, Países Bajos) en la solución acuosa a 95°C a pH 3,5 durante intervalos diferentes (5, 10, 20 y 60 minutos). Después del tratamiento térmico, se analizó la concentración de LF en busca de actividad usando FPLC (cromatografía en fase líquida de rendimiento rápido por sus siglas en inglés) y HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento por sus siglas en inglés; método "Morinaga").

[0053] Los resultados se muestran en la tabla 3. Se descubrió que la FPLC diferencia entre LF nativa y LF desnaturalizada, mientras que la HPLC, como se usa en la técnica (EP-A-437,958), sobreestima sistemáticamente la concentración de LF nativa. Por lo tanto, esta última no proporciona una herramienta satisfactoria para el análisis de LF.

Tabla 3: comparación de métodos en el análisis de contenido de LF usando HPLC vs. FPLC

Tiempo de calentamiento (min)	% LF (FPLC)[a)]	% LF (HPLC)[b)]
0	100%	100%
5	97%	104%
10	95%	103%
20	94%	104%
60	75%	93%
[a] método FPLC realizado conforme a Mitoma et al. (2001): The J. Biol. Chem. 276:18060-18065; [b] método HPLC realizado conforme a Abe et al. (1991) J. Dairy Sci. 74: 65-71;		

Ejemplo comparativo III - efecto del contenido de azúcar

[0054] El efecto de protección del azúcar durante el tratamiento térmico (a 95°C, durante intervalos de tiempo diferentes) se estudió mediante electroforesis en gel iso-electro-enfocada entre pH 3 y 9.

[0055] Los resultados se muestran en la figura 1. De izquierda a derecha: solución de LF bovina al 5% (pH 3,5), tratada térmicamente a 90°C durante 5, 20 y 72 minutos; solución de LF bovina al 5% (pH 3,5) en de solución de glucosa al 42% (pH 3,5), tratada térmicamente a 90°C durante 5, 20 y 72 minutos.

[0056] Se ha observado que la LF en la solución de azúcar estaba más protegida que aquélla en la solución acuosa sin azúcar: la electroforesis en gel mostró que la banda para 5% en peso de LF permaneció invariada aun después de 20 minutos de tratamiento térmico a 90°C, en caso del 42% en peso de contenido de azúcar. En cambio, la banda para LF en la solución acuosa sin azúcar cambió a un margen de pH mayor de pH 9.

[0057] En conclusión, el uso de solución de azúcar durante el tratamiento térmico es capaz de dotar a la solución de LF no sólo de un largo tiempo de almacenamiento sino que también protege la LF frente a la desactivación por tratamiento térmico alargado.

[0058] En aras de la exhaustividad, cabe señalar que un tratamiento térmico de 95°C durante 72 minutos no es muy realista.

Ejemplo comparativo IV - efecto del contenido de azúcar

[0059] Se proporcionaron tres soluciones de LF al 1% a pH 3,7 (usando citrato y bicarbonato) con diferentes concentraciones de sacarosa, a 0%, 15% y 40%. Las composiciones se sometieron a calentamiento a 93 °C.

[0060] En momentos diferentes (después de 0, 10, 35 y 72 minutos de calentamiento) se tomaron muestras y se compararon en cuanto a cambio de color conforme avanzaba el tiempo. Se observó que el color rojizo original (a t = 0) se perdió en casos de 0% y 15% de azúcar, ya en 10 minutos. Esto indica la desnaturalización de la LF. A niveles de azúcar del 40%, se mantuvo mucho del color rojo original, incluso después de 75 minutos de calentamiento. Esto refleja la estabilidad de almacenamiento de la LF tratada térmicamente a un pH y contenido de azúcar según la invención.

[0061] La figura 2 anexa muestra las diferencias entre las muestras anteriormente descritas, donde (A), (B) y (C) representan 0% (control), 15% y 40% de azúcares, respectivamente. En cada imagen, de izquierda a derecha, se comparan muestras como se tomaron después de 0, 10, 35 y 72 minutos, respectivamente.Todas las muestras se toman a un contenido de LF del 1%.

Ejemplo 3 - métodos de análisis II

[0062] El contenido de LF activa se determinó utilizando FPLC, ELISA y pruebas de actividad enlazante de hierro para estudiar la aplicabilidad de ambos métodos de análisis. El jarabe que contenía LF contenía el 0,26 % en peso de LF, 42% jarabe de sólidos A, y se trató térmicamente a 90°C durante 5, 20 y 60 minutos. Se tomaron muestras y se analizaron para ver la retención de LF y la LF funcionalmente activa en intervalos de tiempo diferentes. Los resultados se muestran en la tabla 4.

[0063] Se ha observado que FPLC es un método fiable en la valoración de la actividad de LF, ya que los resultados casi coincidieron con aquéllos descubiertos usando ELISA bien establecido. La concentración de LF fue sobreestimada utilizando un ensayo enlazante de hierro.
Una explicación posible para cualquier discrepancia puede deberse al hecho de que en un tratamiento térmico prolongado, la LF pierde su estructura nativa, cambiando así el tiempo de retención con FPLC, mientras que su actividad enlazante de hierro se mantiene.

Tabla 4: LF retención de LF (%) usando FPLC, ELISA y prueba enlazante de hierro

Muestra	Tiempo de calentamiento (min)	Elisa [a)]	FPLC	Actividad enlazante de hierro [b)]
1	0	100%	100%	100%
2	5	87%	80%	97%
3	20	51%	56%	94%
4	60	17%	29%	65%

[a] equipo ELISA Bovine Lactoferrin Kit obtenido de Biocompare. El método se refiere a Cheng et al. (2007) J. Dairy Sci. 91:970-976

[b] medidas de actividad enlazante de hierro realizadas conforme a Brisson et al. (2007) International Dairy Journal. 17: 617-624.

REIVINDICACIONES

1. Composición acuosa que contiene lactoferrina, 35 - 70 % en peso de estabilizadores de carbohidrato y/o poliol, en base al peso total de la composición acuosa, dicha composición muestra un pH superior a 2, inferior a 5.

2. Composición según la reivindicación 1, que se ha sometido a una temperatura de al menos 60 °C.

3. Composición según la reivindicación 2, que ha sido esterilizada o hervida.

4. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dichos estabilizadores de carbohidrato y/o poliol se seleccionan del grupo consistente en monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos, oligosacáridos, manitol, galactitol, inositol, xilitol, sorbitol, glicerol y lactitol, y sus mezclas derivadas.

5. Composición según la reivindicación 4, dicho estabilizador de carbohidrato contiene al menos el 45% de monosacáridos de glucosa y fructosa.

6. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicha lactoferrina está presente en una cantidad de 0,05 - 20% en peso, en base al peso total de la composición acuosa.

7. Composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que muestra un pH en el rango de 2,5 - 4.

8. Método de estabilización de lactoferrina con calor, a) proporcionando una composición acuosa que contiene lactoferrina, 35 - 70% en peso de estabilizadores de carbohidrato y/o poliol, en base al peso total de la composición acuosa, dicha composición muestra un pH superior a 2, inferior a 5, y donde dicha composición excluye geles, y b) sometiendo dicha composición acuosa a un tratamiento térmico.

9. Método según la reivindicación 8, donde dicho tratamiento térmico implica una temperatura de al menos 60 °C.

10. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7 o la composición obtenida mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 9 en alimentos (saludables), comida para animales, suplementos nutricionales, cosméticos o medicinas.

11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7 o composición obtenida mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 9 para su uso en el tratamiento (profiláctico) del acné.

12. Alimento, comida para animales, suplemento nutricional, cosmético o producto médico que contiene lactoferrina estabilizada térmicamente mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 9.

13. Alimento, comida para animales, suplemento nutricional, cosmético o producto médico según la reivindicación 12, que contiene lactoferrina en una cantidad de 0,05 - 10% en peso, en base al peso total.

14. Equipo de partes que comprenden: i) una formulación líquida que contiene lactoferrina estabilizada térmicamente mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones 8 - 9, y ii) una composición alimentaria líquida, preferiblemente una fórmula infantil.

Fig 1

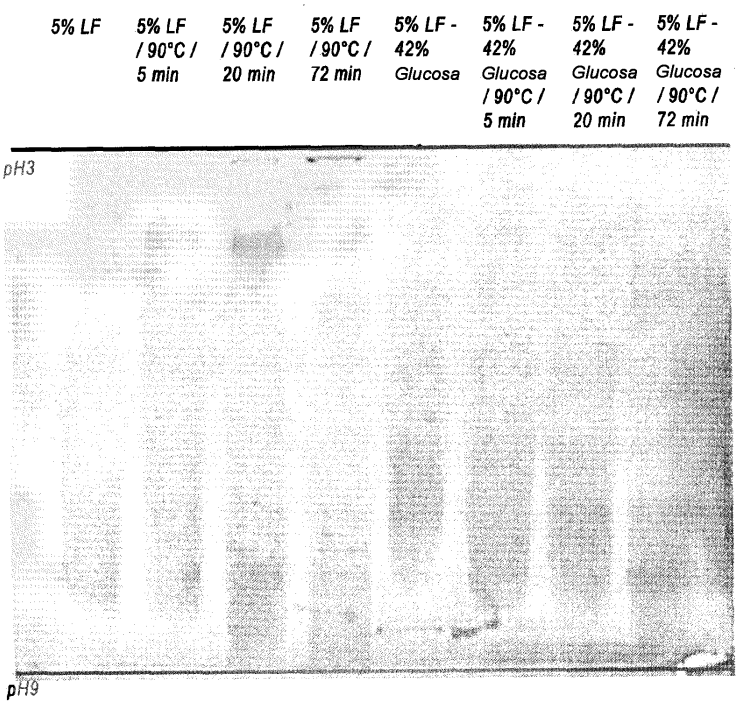
5% LF
5% LF / 90°C / 5 min
5% LF / 90°C / 20 min
5% LF / 90°C / 72 min
5% LF - 42% Glucosa
5% LF - 42% Glucosa / 90°C / 5 min
5% LF - 42% Glucosa / 90°C / 20 min
5% LF - 42% Glucosa / 90°C / 72 min
pH3
pH9

Fig 2a

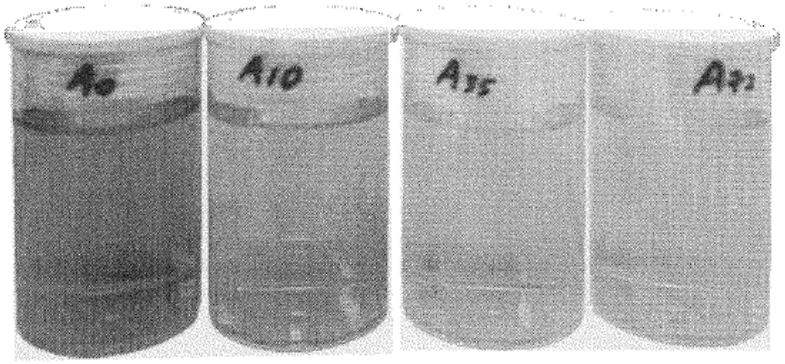

Fig 2b

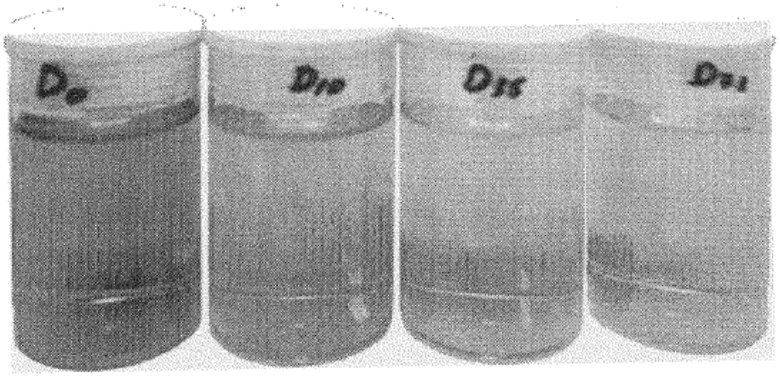
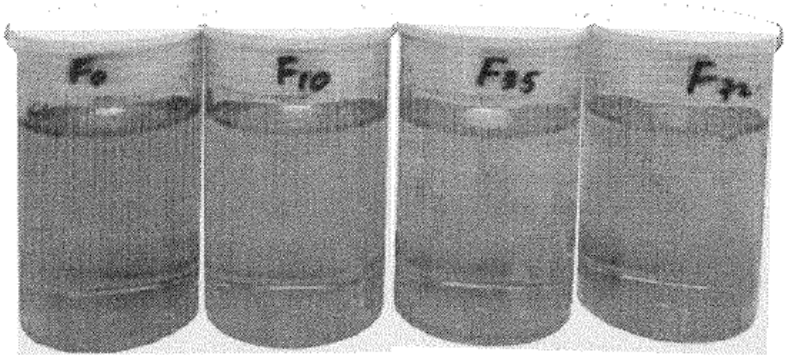
Fig 2c