

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 381**

51 Int. Cl.:

A23B 5/00 (2006.01)
A23B 5/015 (2006.01)
A23B 5/03 (2006.01)
A23L 3/015 (2006.01)
A23L 3/32 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01)
A23L 1/32 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013 E 13728381 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2806745**

54 Título: **Proceso para producir una composición que contiene folistatina activa**

30 Prioridad:

11.06.2012 EP 12171561
12.02.2013 US 201313765340

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2016

73 Titular/es:

**DEUTSCHES INSTITUT FÜR
LEBENSMITTELTECHNIK E.V. (100.0%)
Prof.-von-Klitzing-Strasse 7
49610 Quakenbrück, DE**

72 Inventor/es:

**BUXMANN, WALDEMAR;
HEINZ, VOLKER y
TÖPFL, STEFAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 561 381 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

Proceso para producir una composición que contiene folistatina activa

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir una composición que comprende folistatina biológicamente activa a partir de una fuente biológica, cuya composición está preservada y, especialmente carece de patógenos y es estable durante su almacenamiento, preferentemente a temperatura ambiente. Se ha descubierto que la folistatina es una glucoproteína secretada que tiene actividad para inhibir miembros de la familia de TGF- β , preferentemente para inhibir la miostatina. Tras la ingestión, la composición tiene actividad para soportar, inducir y/o regular positivamente el aumento de musculatura en seres humanos y en animales. Por tanto, la composición es adecuada para su uso como un ingrediente alimentario o aditivo de nutrición para seres humanos o animales, por ejemplo para su uso como un compuesto para mejorar el aumento de la musculatura y/o su regeneración.

15 Preferentemente, el proceso para producir la composición, y la composición en sí misma, carecen de conservantes químicos añadidos, lo más preferentemente, el proceso para producir la composición, y la composición, respectivamente, consisten en los componentes naturales del material de partida, huevo y sus componentes, preferentemente yema de huevo, incluyendo opcionalmente clara de huevo, sometidos únicamente a las etapas de tratamiento físico del proceso. En la alternativa a la yema de huevo, la clara de huevo, que también se denomina blanco del huevo o albumen de huevo, y todo el huevo, pueden someterse a las etapas del proceso.

20 Estado de la técnica

El documento US 2007/0275036 A1 describe que se sabe que la folistatina está presente en huevos de aves fertilizados y que es biológicamente activa para aumentar la masa muscular y para facilitar la regeneración muscular en seres humanos. Considerando que se ha mostrado que la pasteurización de la yema de huevo líquida inactiva la actividad biológica de la folistatina contenida en la misma, se describe que puede irradiarse yema de huevo emulsificada mediante liofilización, por ejemplo, con radiación gamma o mediante un haz de electrones para su conservación sin activar la folistatina.

30 Objetivos de la invención

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un proceso alternativo para producir una composición que contenga folistatina activa a partir de huevo fertilizado.

35 Descripción general de la invención

La invención consigue el objetivo mediante las características de las reivindicaciones, y especialmente se refiere a un proceso para producir una composición que contiene folistatina biológicamente activa a partir de huevos de aves o sus componentes, especialmente a partir de yema de huevo, clara de huevo o huevo completo, comprendiendo el proceso la conservación mientras se mantiene una temperatura por debajo de 38 °C, preferentemente por debajo de 20 °C, más preferentemente por debajo de 10 °C, etapa de conservación que comprende o consiste en someter a la yema de huevo líquida a una presión de al menos 400 MPa (4000 bar), durante al menos 1 minuto, preferentemente a 550-650 MPa (5500-6500 bar), más preferentemente a 600 MPa (6000 bar) durante al menos 1 minuto, preferentemente durante 3 minutos, más preferentemente durante al menos 5 minutos, preferentemente usando una compresión adiabática y liberación de presión, y/o tratamiento mediante campo electrónico pulsante, preferentemente en un proceso continuo mientras se bombea el huevo líquido o sus componentes, especialmente yema de huevo, clara de huevo o huevo completo, a través del espacio limitado por al menos 2 electrodos de descarga, por ejemplo generando una fuerza de campo eléctrico de 5 a 40 kV/cm, por ejemplo a 12 kV/cm a un caudal de la yema de huevo líquida de 30 l/h, a una temperatura de 30 °C, preferentemente usando pulsos unipolares que tienen una duración de pulso de 5 a 20 μ s, preferentemente de 10 μ s, a una tasa de repetición de 70 a 200 Hz, especialmente pulsos rectangulares positivos. A una aportación de energía de 50 a 140 kJ/kg, la disminución de la contaminación bacteriana, determinada como UFC, estuvo en un factor de 10 a 630, respectivamente. Preferentemente, los huevos de aves se obtienen de gallinas, es decir *Gallus domesticus*.

55 Las realizaciones de la etapa de conservación son etapas de proceso no térmicas, es decir un aumento en la temperatura que puede suceder durante el tratamiento de alta presión y/o tratamiento de campo electrónico pulsante no es causante de la reducción en micro-organismos, especialmente de bacteria para conseguir la conservación. Además, las realizaciones de la etapa de conservación son métodos de conservación de tratamiento físico, es decir sin adición de compuestos químicos antimicrobianos. Por consiguiente, las realizaciones de la etapa de conservación son etapas de proceso no térmicas que consisten en etapas de tratamiento físicas, que no generan radicales y por tanto mantienen la estructura química de los ingredientes, especialmente de ácidos grasos insaturados y vitaminas de la composición.

60 Descripción general de la invención

65 Se descubrió que el tratamiento del alta presión y/o el tratamiento de campo electrónico pulsante de un material de

partida, que es preferentemente huevo completo líquido, clara de huevo líquida, preferentemente yema de huevo líquida, y/o suero de sangre animal, reduce eficazmente la contaminación bacteriana en un factor de al menos 10, preferentemente en un factor de al menos 100, más preferentemente de al menos 1000. Por ejemplo, para tratamiento de alta presión, se descubrió una reducción de la contaminación bacteriana a aproximadamente 50 UFC/g, correspondiente a una reducción en un factor de 3000, cuando se partió de yema de huevo líquida si procesar que tenía un contenido bacteriano natural de $1,5 \times 10^5$ UFC/g. Para el tratamiento de campo electrónico pulsante, se descubrió una reducción en un factor de 10 a un factor de 1000. La reducción de la contaminación microbiológica natural mediante el tratamiento de alta presión y/o el tratamiento de campo electrónico pulsante es suficiente para conservar la clara de huevo, huevo completo o yema de huevo.

Preferentemente, el proceso posterior a la etapa de conservación comprende el secado, especialmente liofilización de la preparación de huevo líquido, especialmente yema de huevo, clara de huevo o huevo completo, o suero de sangre animal, respectivamente, dando como resultado un polvo que contiene huevo, especialmente un polvo que contiene yema de huevo, clara de huevo o huevo completo, o suero de sangre animal en polvo, preferentemente en un polvo que consiste esencialmente en huevo o constituyentes de huevo tratados a alta presión y/o tratados mediante campo electrónico pulsante, por ejemplo yema de huevo, clara de huevo o huevo completo, o constituyentes de suero sanguíneo, respectivamente. En la alternativa al criodeseado, el secado puede ser secado de lecho fluidizado, preferentemente a una temperatura de, o por debajo de, 42 °C, preferentemente de, o por debajo de, 40 °C, más preferentemente de, o por debajo de, 38 °C o de, o por debajo de, 35 °C.

Se ha descubierto que el proceso para producir la composición que contiene folistatina que comprende una etapa de conservación que comprende o que consiste en tratamiento de alta presión y/o tratamiento de campo pulsante, preferentemente con secado posterior, especialmente, pero sin limitación, liofilización, conduce tanto a una reducción eficaz de la contaminación bacteriana según se determina, por ejemplo, como bacteria viable, y a la folistatina que mantiene su actividad biológica, por ejemplo a al menos el 50 %, preferentemente a al menos el 70 %, más preferentemente a al menos el 80 %, más preferentemente a al menos el 85 %, a al menos el 90 % o a al menos el 95 %, con referencia a la activada de folistatina en la composición de yema de huevo usada como el compuesto de partida.

Especialmente a la vista de los procesos de conservación que usan irradiación, es una ventaja del proceso de la invención que no se generen radicales mediante la etapa de conservación y por tanto, yema de huevo líquida, clara de huevo o huevo completo, o suero de sangre animal, conservado resultante que preferentemente se seca posteriormente, preferentemente criodeseca, contiene menos o ningún radical ni productos de radicales de reacción. Por ejemplo, la yema de huevo líquida, clara de huevo o huevo completo conservado, así como la yema de huevo, clara de huevo o huevo completo conservado secado, preferentemente liofilización, contiene ácidos grasos insaturados de la yema de huevo esencialmente en su composición y estado natural, por ejemplo sin cambios en sus dobles enlaces. Por consiguiente, la composición obtenible por el proceso de la invención contiene preferentemente los ácidos grasos insaturados de yema de huevo sin cambios en sus dobles enlaces, es decir en su constitución biológica natural.

En la alternativa a huevo completo o yema de huevo, puede usarse la clara del huevo en el proceso.

Preferentemente, en el proceso, no se añade ningún conservante químico, por ejemplo no se añade ningún agente antimicrobiano. Opcionalmente, se añade un antioxidante, por ejemplo ácido ascórbico o una sal neutra del mismo. Preferentemente, el huevo completo, clara de huevo, más preferentemente yema de huevo, o suero de sangre animal, respectivamente, está únicamente libre de ingredientes añadidos, por ejemplo el huevo completo, clara de huevo, o más preferentemente la yema de huevo, o el suero de sangre animal, respectivamente, se somete únicamente a las etapas de proceso físicas, que comprenden, preferentemente consisten en, someter huevo completo líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida o suero, respectivamente, a tratamiento de alta presión y/o a tratamiento de campo pulsante, preferentemente seguido de secado, por ejemplo liofilización o secado de lecho fluidizado.

Para el tratamiento de alta presión, se prefiere que el huevo completo líquido, la clara de huevo o la yema de huevo líquida, o el suero de sangre animal, respectivamente, estén contenidos en envases herméticamente cerrados que tengan una pared elástica, por ejemplo en bolsas de plástico, más preferentemente sin gas, más preferentemente desgasificadas. Para un huevo completo sin gas, las burbujas de gas pueden expelerse de la clara de huevo o de la yema de huevo líquida, o del suero de sangre animal, respectivamente, en un envase, antes de cerrar herméticamente el envase. Para desgasificar, puede aplicarse una presión reducida antes de un tratamiento de alta presión, preferentemente también antes de un tratamiento de campo pulsante.

El tratamiento de alta presión se realiza generalmente usando agua como medio de compresión, que se bombea en una cámara herméticamente cerrada que contiene el huevo completo líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida, o suero de sangre animal, respectivamente, hasta que se alcanza la alta presión, manteniendo la alta presión, y después liberando la presión, por ejemplo mediante la apertura del envase de alta presión.

Se descubrió que después de un tratamiento de alta presión dentro de envases herméticamente cerrados, por

ejemplo, en bolsas de polietileno herméticamente cerradas, la preparación del huevo completo líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida es estable, por ejemplo durante 12 a 24 horas, preferentemente durante 2 a 5 días, por ejemplo de 5 a 10 °C, sin un aumento drástico en la contaminación bacteriana, y especialmente sin una pérdida significativa de actividad de folistatina. Para tratamiento de alta presión, el aumento adiabático en la temperatura debido a la alta presión se contrarresta preferentemente enfriando el huevo completo líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida a una temperatura que es al menos 5 °C, preferentemente aproximadamente 10 °C por debajo de la temperatura máxima, por ejemplo por debajo de 38 °C antes del tratamiento. Preferentemente, antes de un tratamiento de alta presión y/o antes del tratamiento de campo electrónico pulsante, el huevo completo líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida se enfría a una temperatura de entre 0 y 28 °C, preferentemente a entre 5 y 20 °C, más preferentemente a un máximo de 10 °C.

Para el tratamiento de campo pulsante, se descubrió que un leve aumento en la temperatura, por ejemplo a un máximo de 45 °C, preferentemente a un máximo de 42 °C o a 40 °C, durante como máximo 10 s, preferentemente durante como máximo 5 o como máximo 2 s da como resultado una pequeña pérdida de folistatina activa. Por consiguiente, para el tratamiento de campo electrónico pulsante, el leve aumento de temperatura mencionado es aceptable, aunque menos preferido.

Se determinó la folistatina activa mediante separación por tamaños, por ejemplo mediante HPLC de exclusión de tamaño o mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), opcionalmente seguido de transferencia de Western y detección inmunoespecífica usando un anticuerpo anti-folistatina. Una reducción de la señal específica de tamaño identificada para folistatina en yema fresca de huevos fertilizados se usó como un indicador para la reducción de la actividad de folistatina, debido a una inactivación de los resultados en el cambio, por ejemplo reducción del tamaño de molécula.

Preferentemente, el proceso comprende la etapa de concentrar el huevo completo, clara de huevo o yema de huevo de los huevos fertilizados. Para la concentración, se usa la fracción de huevo completo, de clara de huevo o de yema de huevo que tiene la proporción mayor de folistatina, obteniéndose la fracción, por ejemplo, mediante separación por tamaños o por separación de densidad. La fracción preferida es la fracción que contiene la membrana de yema de huevo, por ejemplo obtenida de la separación de yema de huevo o huevo completo, y la fracción que contiene chalazas, por ejemplo obtenida de la separación de la clara de huevo o huevo completo. Preferentemente, la fracción preferida contiene la porción principal de las membranas de yema de huevo y/o de las chalazas del huevo completo, clara de huevo o yema de huevo sometidas a la etapa de concentración o separación. Para separar mediante separación por tamaños, puede usarse tamizado, por ejemplo de un tamaño de malla de 0,5 mm a 2 mm, preferentemente aprox. de 0,5 a 1 mm. Usando la separación por tamaño, la fracción preferida es la fracción que contiene chalazas y/o membrana de yema de huevo, que es la partícula o fracción grande. Para separar por separación de densidad, se usa centrifugación, usando, por ejemplo, un separador centrífugo. Usando separación por densidad de huevo completo, clara de huevo o yema de huevo, la fracción de mayor densidad es la fracción preferida.

Opcionalmente, antes de la etapa de concentración del huevo completo, clara de huevo o yema de huevo de huevos fertilizados por separación de la fracción que contiene la membrana y/o las chalazas de yema de huevo, el huevo completo, la clara de huevo o la yema de huevo puede diluirse para facilitar la etapa de separación, por ejemplo usando agua como diluyente, conteniendo el agua opcionalmente sal.

En la alternativa o además de huevo completo, clara de huevo o yema de huevo de huevos fertilizados, el proceso puede realizarse usando suero sanguíneo de animales sacrificados como el material de partida. Por consiguiente, el suero sanguíneo puede reemplazar al huevo completo, clara de huevo o yema de huevo en el proceso, y por tanto la descripción relativa a huevo completo, clara de huevo o yema de huevo también se refiere a suero sanguíneo. En esta realización, el proceso para producir una composición que contiene folistatina biológicamente activa comprende la etapa de proporcionar suero de sangre animal sin procesar y someter el suero de sangre animal si procesar a una etapa de conservación mientras se mantiene la temperatura a, o por debajo de, 38 °C, en el que la etapa de conservación se selecciona entre someter el suero de sangre animal sin procesar a un tratamiento de alta presión de al menos 150 MPa (4500 bar) durante al menos 1 min, entre someter el suero de sangre animal sin procesar a un tratamiento de campo pulsante de al menos 5 kV/cm a un caudal de 30 l/h, y entre una combinación del tratamiento de alta presión y el tratamiento de campo electrónico pulsante para proporcionar un suero de sangre animal sin procesar, líquido, conservado. La etapa de conservación puede consistir en un tratamiento de alta presión, en el que el suero de sangre animal sin procesar se carga en envases, los envases se cierran herméticamente y se someten a la alta presión. La etapa de conservación puede consistir en tratamiento de campo pulsante del suero de sangre animal sin procesar mediante un campo eléctrico de 5 a 40 kV/cm. Posteriormente a la etapa de conservación, el suero de sangre animal sin procesar conservado puede secarse opcionalmente, por ejemplo mediante liofilización o por secado de lecho fluidizado. Preferentemente, entre la etapa de tratamiento de alta presión y la etapa de liofilización, el suero de sangre animal sin procesar se transporta en los envases herméticamente cerrados en los que el suero de sangre animal sin procesar se sometió al tratamiento de alta presión.

Opcionalmente, el proceso puede comprender la etapa adicional de mezclar o encapsular el huevo o constituyente de huevo conservado seco. Preferentemente, para el mezclado o encapsulado, la yema de huevo, huevo completo o

- 5 clara de huevo seca, o como alternativa el suero sanguíneo seco, se mezcla con una solución, preferentemente una solución acuosa de un agente encapsulante. El agente encapsulante puede ser, por ejemplo, un azúcar, alcohol de azúcar y/o polímero de azúcar, una solución de la cual se mezcla en el proceso con la yema de huevo, huevo completo o clara de huevo conservada y seca, o como alternativa el suero sanguíneo seco, y se seca para producir yema de huevo, huevo completo o clara de huevo encapsulada seca, o como alternativa el suero sanguíneo seco. El azúcar puede ser, por ejemplo, sacarosa, fructosa, glucosa y/o sirope de maíz. El alcohol de azúcar puede ser, por ejemplo, maltitol, isomaltosa, etc. El polímero de azúcar puede ser, por ejemplo, almidón, almidón modificado y/o celulosa y/o metilcelulosa, que preferentemente también sirve como agente un agente antiapelmazante.
- 10 Como una ventaja específica del tratamiento de alta presión de la yema de huevo líquida, del huevo completo o de la clara de huevo, se ha descubierto que se potencia la biodisponibilidad y la digestibilidad de la proteína, preferentemente de la proteína total. Por tanto, se prefiere que el proceso comprenda la etapa de tratamiento de alta presión de yema de huevo líquida, huevo completo o clara de huevo para producir una composición conservada que contiene folistatina biológicamente activa, en el que la composición de la proteína tiene biodisponibilidad aumentada,
- 15 por ejemplo digestibilidad aumentada, por ejemplo en relación a la yema de huevo líquida, huevo completo o clara de huevo sin tratar.

Descripción detallada de la invención

- 20 La invención se describe ahora mediante ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: producción de yema de huevo conservada que contiene folistatina activa

- 25 Se usaron huevos de gallina (*Gallus domesticus*) fertilizados, obtenidos de una estación de cría certificada, cuyos huevos no se habían incubado. Los huevos se cascaron y automáticamente se separaron en yema de huevo y clara de huevo. Como yema de huevo líquida sin procesar, se usaron 3000 l de yema de huevo que preferentemente se homogeneizaron mediante mezclado, se mantuvieron a entre 5 y 10 °C y se cargaron en bolsas de polietileno en condiciones estériles y se cerraron herméticamente después de la expulsión de las burbujas de aire atrapadas. Estas bolsas de polietileno podrían tener un volumen de entre 1 l y 50 l, preferentemente de 5 a 20 l cada una.
- 30 Las bolsas se dispusieron en una cámara de alta presión (NC-Hyperbaric, España). Usando agua como medio de presurización, la presión se aumentó a 600 MPa (6000 bar) en 10 a 20 minutos. Después de un tiempo de espera de 3 o 5 minutos, respectivamente, la presión se liberó abriendo una válvula de descarga.

- 35 La contaminación bacteriana se determinó preparando cultivos en placas de dilución convencionales en medio completo y realizando el recuento después del cultivo en una incubadora a 37 °C durante 48 h. Se mantuvieron alícuotas de la yema de huevo tratada a alta presión a aproximadamente 5 °C durante algunas horas y posteriormente se criodesecaron congelando la yema de huevo y aplicando vacío para retirar el agua, mientras se controlaba la temperatura de la yema de huevo para que preferentemente no excediera 10 °C, preferentemente 5 °C, preferentemente manteniendo la yema de huevo en un estado de congelación.

- 40 Los análisis microbiológicos mostraron que, el tratamiento de alta presión tanto durante 3 minutos como 5 minutos, produjo una reducción drástica de la contaminación bacteriana, y que también la etapa posterior de liofilización redujo adicionalmente la contaminación bacteriana.

45 Tabla 1: contaminación bacteriana, medida como UFC/g

muestra	Salmonela en muestra de 25 g	Recuento total de células (UFC/g)
yema de huevo líquida sin procesar	Negativa	1,5 x 10 ⁵
yema de huevo líquida después de 600 MPa (6000 bar), 3 min	Negativa	50
yema de huevo líquida después de 600 MPa (6000 bar), 5 min	Negativa	50
yema de huevo criodesecada después de 600 MPa (6000 bar), 3 min	Negativa	40
yema de huevo criodesecada después de 600 MPa (6000 bar), 5 min	Negativa	<10

UFC = unidades formadoras de colonias (microorganismos disponibles)

- 50 La actividad de folistatina en la yema de huevo líquida según se determinó por SDS-PAGE mostró una reducción de aprox. 15 %, o un contenido del 85 % de folistatina activa, basado en el contenido de folistatina activa según se determinó por SDS-PAGE en la yema líquida sin procesar.

En la yema de huevo criodesecada, el contenido de folistatina activa en relación a la concentración de proteína total fue el mismo que en la yema de huevo líquida después de tratamiento de alta presión. Esto muestra que la etapa de liofilización no afecta sustancialmente a la actividad de folistatina, por ejemplo la liofilización no reduce

sustancialmente la concentración de folistatina activa por contenido de proteína total.

Ejemplo 2: Fracción de yema de huevo criodesecada que contiene folistatina activa usando tratamiento de campo pulsante

- 5 Una alícuota de la yema de huevo líquida sin procesar usada en el Ejemplo 1 se trató a un caudal de 30 l/h a 30 °C mediante un campo electrónico pulsante de una intensidad de campo de 12 kV/cm usando pulsos positivos unipolares que tienen una duración de pulso de 10 µs a una tasa de repetición de 200 Hz. A una aportación de energía de 50 a 140 kJ/kg, la contaminación bacteriana viable se redujo en un factor de 10 y 630 UFC, respectivamente, según se determinó mediante preparación de cultivos en placas de dilución.
- 10 Usando SDS-PAGE, se descubrió una reducción de folistatina activa de aprox. 15 %, o una actividad residual de folistatina de 85 % basado en la yema de huevo si procesar. No se observó ninguna desnaturalización térmica de la yema de huevo líquida en SDS-PAGE.

Ejemplo 3: Concentración de huevo completo, clara de huevo o yema de huevo por separación

- 15 El proceso del Ejemplo 1 se repitió con la alteración de que antes del tratamiento de alta presión, la yema de huevo se separó por centrifugación a 3343 x g durante 20 min en una fracción de alta densidad que se recogió en forma de un microgránulo y una fracción de sobrenadante de baja densidad. Se descubrió que, cuanto mayor era la densidad mayor era la fracción de folistatina.
- 20 En la alternativa, se separó huevo completo o clara de huevo mediante centrifugación a 3343 x g durante 20 min en una fracción de alta densidad que se recogió en forma de un microgránulo y una fracción de sobrenadante de baja densidad. De nuevo, se descubrió que, cuanto mayor era la densidad mayor era la fracción de folistatina.
- 25 Los análisis del contenido de folistatina se muestran a continuación:

Fracción	Folistatina [µg/kg]
clara de huevo, antes de centrifugación	15
clara de huevo, microgránulo	33
huevo completo, antes de centrifugación	23
huevo completo, microgránulo	41
yema de huevo, antes de centrifugación	4
yema de huevo, microgránulo	36

- 30 Estos resultados muestran que la separación de la yema de huevo, el huevo completo o la clara de huevo a una fracción de mayor densidad, correspondiente a las membranas y a las chalazas de la yema de huevo, da como resultado una concentración de folistatina aumentada, fracción que después de la etapa de conservación, preferentemente con secado posterior, produce una composición que tiene una concentración de folistatina aumentada.

- 35 Preferentemente, antes de la separación, la yema de huevo, el huevo completo o la clara de huevo no se homogeneizó, por ejemplo, la yema de huevo, el huevo completo o la clara de huevo se pasó a través de un tamiz ancho o se agitó para fracturar únicamente la membrana de la yema de huevo para permitir que saliera la yema de huevo, preferentemente sin romper la membrana o las chalazas de la yema de huevo en trozos pequeños.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir una composición que contiene folistatina biológicamente activa, que comprende la etapa de proporcionar un material de partida seleccionado entre yema de huevo líquida, huevo completo o clara de huevo sin procesar originarios de huevos de aves fertilizados y suero de sangre animal sin procesar y someter el material de partida a una etapa de conservación mientras se mantiene la temperatura a, o por debajo de, 38 °C, **caracterizado por que** la etapa de conservación se selecciona entre someter el material de partida a un tratamiento de alta presión de al menos 450 MPa (4500 bar) durante al menos 1 min, someter el material de partida a un tratamiento de campo eléctrico pulsante de al menos 5 kV/cm a un caudal de 30 l/h y una combinación del tratamiento del alta presión y el tratamiento de campo electrónico pulsante para proporcionar un material de partida conservado, seleccionado entre yema de huevo líquida, huevo completo o clara de huevo conservados y suero de sangre animal si procesar conservado.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la etapa de conservación consiste en tratamiento de alta presión, en el que el material de partida se carga en envases, los envases se cierran herméticamente y se someten a la alta presión.
3. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la etapa de conservación consiste en someter el material de partida a un tratamiento de campo eléctrico pulsante mediante un campo eléctrico de 5 a 40 kV/cm.
4. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por** el secado del material de partida conservado.
5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** el secado es mediante liofilización.
6. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** el secado es mediante secado de lecho fluidizado.
7. Proceso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** entre la etapa de tratamiento de alta presión y la etapa de liofilización, el material de partida conservado se transporta en los envases herméticamente cerrados en los que el material de partida sin procesar se sometió al tratamiento de alta presión.
8. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la yema de huevo líquida sin procesar se proporciona mediante la apertura de huevos de ave fertilizados y la separación de la yema de huevo de la clara de huevo.
9. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, antes de la etapa de conservación, el material de partida sin procesar se enfría a una temperatura máxima de 10 °C.
10. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, antes de la etapa de conservación, el material de partida sin procesar se desgasifica.
11. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, antes de la etapa de conservación, la yema de huevo líquida, el huevo completo o la clara de huevo sin procesar se concentran a una fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o las chalazas.
12. Proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o las chalazas es la fracción de alta densidad obtenida mediante centrifugación y/o la fracción de mayor tamaño obtenida mediante separación por tamaños.
13. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que**, antes de la etapa de conservación, la yema de huevo líquida, el huevo completo o la clara de huevo sin procesar se diluyen con un diluyente y después se concentran a una fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o las chalazas.
14. Proceso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o las chalazas es la fracción de densidad alta obtenida mediante centrifugación y/o la fracción de mayor tamaño obtenida mediante separación por tamaños.
15. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** después de la etapa de conservación, el material de partida conservado se seca y posteriormente se mezcla con una solución de un azúcar, un alcohol de azúcar y/o un polímero de azúcar y se seca para encapsular la yema de huevo líquida, el huevo completo o la clara de huevo.