

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 062**

21 Número de solicitud: 201730923

51 Int. Cl.:

C12P 21/06 (2006.01)

C07K 1/12 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

12.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

18.09.2017

Fecha de concesión:

28.05.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

04.06.2018

73 Titular/es:

EGGNOVO, S.L. (100.0%)
Pol. Industrial San Miguel. Avda Los Tilos nº 5
31132 VILLATUERTA (Navarra) ES

72 Inventor/es:

LA NUEZ GARCÍA, Manuel A. y
AGUIRRE GONZÁLEZ, Andrés

74 Agente/Representante:

MASLANKA KUBIK, Dorota Irena

54 Título: **PROCEDIMIENTO Y COMPOSICIÓN DE HIDROLIZACIÓN DE MEMBRANA DE CÁSCARA DE HUEVO**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un procedimiento de hidrolización de membrana de cáscara de huevo, que comprende la etapa de tratar una cantidad adecuada de cáscara de huevo en una disolución que contiene un agente desnaturalizante, un agente reductor, un tampón y una enzima. La invención también se refiere a una composición para la hidrolización de membrana de cáscara de huevo según el procedimiento anterior.

ES 2 633 062 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y composición de hidrolización de membrana de cáscara de huevo.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere de manera general al campo de la obtención de productos solubles de proteínas, y más concretamente a la hidrolización de membrana de cáscara de huevo.

Antecedentes de la invención

10 La membrana de la cáscara de huevo es muy rica en metabolitos con interés biológico tales como colágeno, elastina, glicosaminoglicanos (ácido hialurónico, sulfato de condroitina, heparán sulfato, dermatán sulfato) así como glucosamina. Algunos estudios han publicado que en la membrana de la cáscara de huevo se han identificado más de 500 proteínas involucradas en el proceso de mineralización de la cáscara de huevo así como la protección del embrión, todas ellas constituyentes de gran valor que podrían emplearse como suplemento orientados a la mejora de la calidad de la piel y articulaciones.

15 Así, la generación de altas cantidades de cáscara de huevo por la industria proporciona una gran cantidad de oportunidades para la obtención de dos materias primas fundamentales: carbonato de calcio (parte inorgánica de la cáscara) y la membrana testácea, que consiste en dos membranas, una interna y otra externa, entrelazadas mediante fibras que forman una apretada malla que hace a su estructura insoluble.

20 En efecto, en la industria se conoce un problema técnico relacionado con la naturaleza insoluble de la membrana de la cáscara de huevo. En concreto, esta insolubilidad está provocada por la naturaleza fibrosa y la composición estructural de la membrana. En concreto, se debe en su mayor parte a colágeno entrecruzado con elastina y queratina, además de muchos enlaces disulfuro que se encuentran formando parte de este entramado.

25 En el campo de la solubilización de proteínas en general, deben degradarse las proteínas hasta el punto en que puedan pasar al seno de la disolución, lo cual se logra mediante hidrólisis. Generalmente se aplican hidrólisis alcalinas o ácidas, que tienen el inconveniente de degradar parte de la composición de la proteína original disminuyendo su valor nutritivo o incluso eliminando constituyentes de modo que no se permitirá una
30 caracterización precisa de la proteína. Otro tipo de hidrólisis muy empleada en la obtención de proteínas hidrolizadas es la vía enzimática. Muchos subproductos proteicos de la industria se aprovechan usando este proceso, como es el caso de la obtención de hidrolizados de pescado y de suero de leche que, al mantener una calidad nutricional, se usan como complementos en la industria alimentaria.

35 Por tanto, existen tres vías fundamentales para solubilizar las proteínas: hidrólisis ácida, básica y enzimática. Tal como se mencionó anteriormente, tanto la ácida como la básica tienen el inconveniente de destruir algunos constituyentes de interés y disminuir el valor nutritivo de algunas de las proteínas. La hidrólisis enzimática tiene la ventaja de aplicar condiciones leves que permiten obtener un producto de mejores características
40 nutricionales y posibles bioactividades y por tanto resulta preferible. Sin embargo, en el caso de la membrana de la cáscara de huevo no es posible aplicar una hidrólisis enzimática clásica debido a la elevada resistencia de la membrana a las enzimas.

45 El documento EP 2612922 A1 da a conocer un método de solubilización de la membrana de cáscara de huevo mediante el uso de una proteasa y un agente reductor, sin embargo dicho método no proporciona una eficacia aceptable. Por tanto, sería deseable disponer de un método de hidrolización de membrana de cáscara de huevo que proporcione

rendimientos de solubilización mejorados.

En situaciones de enfrentarse a proteínas muy difíciles de hidrolizar, también se conoce emplear combinaciones de varias proteinasas (cóctel) para una hidrolización efectiva de las mismas. No obstante, el uso de una combinación de enzimas aumenta los costes del procedimiento.

Por tanto, también sería deseable disponer de un procedimiento que permita obtener una eficacia de solubilización de membrana de cáscara de huevo adecuada con una sola proteinasa de tal modo, que se permita realizar un análisis preciso de los constituyentes de la misma manteniendo una alta integridad de las proteínas y el resto de los metabolitos presentes con un coste de procedimiento mínimo.

Sumario de la invención

Para solucionar los problemas de la técnica anterior, la presente invención da a conocer, según un primer aspecto, un procedimiento de hidrolización de membrana de cáscara de huevo, que comprende la etapa de tratar una cantidad adecuada de membrana de cáscara de huevo en una disolución que contiene un agente desnaturizante, un agente reductor, un tampón y una enzima.

Según un segundo aspecto, la presente invención también da a conocer una composición de hidrolización de membrana de cáscara de huevo adecuada para su uso en el procedimiento del primer aspecto de la presente invención. En concreto, la composición de hidrolización comprende agente desnaturizante, un agente reductor, un tampón y una enzima.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes dibujos que ilustran una realización preferida de la invención, proporcionados a modo de ejemplo, y que no deben interpretarse como limitativos de la invención de ninguna manera:

La figura 1 es un gráfico que muestra el porcentaje de disolución de OVOMET acumulado en función del tiempo para diversas razones de dilución.

La figura 2 es un gráfico que muestra el % de absorción en seres humanos en función del logaritmo de la permeabilidad aparente.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención da a conocer un procedimiento de hidrolización de membrana de cáscara de huevo así como una composición para su uso en dicho procedimiento. Debido a la elevada resistencia de la membrana de la cáscara de huevo a su degradación y solubilización explicada anteriormente, el procedimiento según la presente invención recurre al uso de aditivos que pueden desnaturizar las proteínas de modo que las enzimas puedan acceder más fácilmente a los enlaces a los que ejercen su acción.

Por tanto, el procedimiento según la realización preferida de la presente invención comprende tratar una cantidad adecuada de membrana de cáscara de huevo en una disolución que contiene un agente desnaturizante, un agente reductor, un tampón y una enzima, de modo que en el producto resultante pueden cuantificarse los principales componentes biológicos de la membrana sin ningún tipo de interferencia, y los hidrolizados de membrana así obtenidos pueden usarse posteriormente como materias primas en la elaboración de suplementos alimenticios, productos de dermocosmética y productos biofarmacéuticos, entre otros.

Las realizaciones preferidas de la presente invención incluyen una o varias de las siguientes características:

5 - el desnaturalizante presenta propiedades detergentes y carácter anfífilo, y preferiblemente es un tensioactivo aniónico, más concretamente laurilsulfato de sodio (SDS) o taurocolato de sodio;

10 - el agente reductor es de naturaleza sulfurada, puede romper puentes disulfuro, no generara interferencias en las posteriores cuantificaciones y se selecciona del grupo constituido por aditivos alimentarios, más concretamente por hidroximetanosulfonato de sodio ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}$), metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y ditioneitol (DTT), más preferiblemente se selecciona de metabisulfito de sodio y DTT, y aún más preferiblemente es metabisulfito de sodio;

- la enzima es una proteasa de origen vegetal, con actividad endopéptidasa del grupo de las cisteín proteasas, preferiblemente seleccionada del grupo constituido por papaína y bromelina.

15 Para poder conseguir una correcta hidrólisis de la membrana de cáscara de huevo, en primer lugar es necesario alterar la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria de la misma para que por último las enzimas puedan acceder y proceder con la hidrólisis propiamente dicha. Para ello el uso de un agente desnaturalizante tiene como objetivo la rotura de la estructura bi y tridimensional de las proteínas por el hecho de añadir carga
20 negativa a los aminoácidos. De este modo, al repelerse las proteínas se deshace el enmarañamiento de las mismas y vuelve más fácil el acceso de la enzima para su hidrólisis.

25 Durante los experimentos, se sometieron a prueba agentes desnaturalizantes sin propiedades detergentes, tales como la urea, sin obtener resultados de disolución satisfactorios. Sin embargo, al someter a prueba agentes desnaturalizantes con propiedades detergentes, tales como SDS y taurocolato, se obtuvieron sorprendentemente excelentes resultados. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se piensa que al contar estos detergentes en su estructura con una parte polar y otra apolar (carácter anfífilo), esto hace que productos apolares pasen al seno de la disolución acuosa.

30 Debido al gran número de puentes disulfuro existentes en las proteínas de la membrana de la cáscara de huevo, se observó que además de utilizar un agente desnaturalizante era necesario utilizar algún agente reductor con capacidad de romper dichos puentes disulfuro que hacían que algunas estructuras cuaternarias permanecieran inalteradas tras el uso del agente desnaturalizante. Para ello se estudiaron varios agentes reductores, obteniéndose sorprendentes resultados con el ditioneitol (DTT) y el metabisulfito
35 de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$).

Sin desear limitarse a ninguna teoría específica, el siguiente esquema muestra un posible modo de acción de los aditivos empleados (agente desnaturalizante y agente reductor) sobre la estructura de las proteínas:

Esquema 1



40

En el esquema se observa que, al actuar el SDS o el taurocolato, las proteínas quedan al descubierto para recibir el ataque de la enzima. El agente reductor termina por llevar las proteínas a una estructura desnaturalizada. Una vez que se formen péptidos por la

acción de la enzima, el SDS o el taurocolato los mantiene en solución.

Una vez demostrado que las proteínas de la membrana de la cáscara de huevo quedan completamente accesibles a las enzimas, que en última instancia son las responsables de la hidrólisis del producto, se procedió a seleccionar diferentes enzimas para someter a prueba su eficacia. Para ello, se evaluaron diferentes endopeptidasas, debido a que el objetivo era desdoblar los enlaces peptídicos del centro de las proteínas. Por otra parte, dada la gran cantidad de restos de cisteína que presenta la membrana de cáscara de huevo, además del hecho de que los puentes disulfuro se establecen a través de los grupos azufrados de dicho aminoácido, resultó conveniente seleccionar enzimas que pertenecieran a la familia de las cisteín proteasas. Se sometió a prueba la eficacia de diferentes enzimas y se observó que las cisteínproteasas eran en efecto las más adecuadas.

Por tanto, las realizaciones preferidas de la presente invención proporcionan un procedimiento, así como una composición, para hidrolizar de manera adecuada la membrana de cáscara de huevo. Dicho procedimiento y composición de la membrana de cáscara de huevo pueden aportar varios usos en la técnica. Por ejemplo, según una realización preferida, el procedimiento y la composición de hidrolización de la membrana de cáscara de huevo permiten determinar los constituyentes de interés de la membrana (GAG, colágeno, etcétera) y usarlos como parámetros de calidad a tener en cuenta con el fin de comparar productos similares en el mercado.

En un realización preferida, el procedimiento de la presente invención comprende la etapa de tratar una cantidad de membrana de cáscara de huevo en un rango de entre 5 y 155 mg/ml, preferiblemente de entre 20 y 150 mg/ml y más preferiblemente de 70 mg/ml, en una disolución que contiene metabisulfito de sodio en un rango de entre 50 y 150 mM, preferiblemente de 100 mM, SDS al 0,5-5% en tampón HEPES 25-50 mM, preferiblemente 50 mM ajustado a pH entre 6 y 7, preferiblemente 6,2, añadiéndose a dicha disolución una disolución de papaína al 1% en cloruro de sodio en un rango de 0,05 a 0,5 M, preferiblemente 0,15 M hasta que la concentración final de papaína en la disolución es de 0,05-0,5%.

Según otra realización preferida de la invención, el procedimiento y la composición de hidrolización de membrana de cáscara de huevo permiten obtener un producto de membrana de cáscara de huevo soluble para fines de obtención a escala industrial y poder ser empleado en diversos sectores de consumo, por ejemplo en el sector de suplementos alimenticios, cosmética, productos biofarmacéuticos, etc.

En otra realización preferida, la composición de la presente invención comprende metabisulfito de sodio en un rango de entre 50 y 150 mM, preferiblemente de 100 mM, SDS al 0,5-5% en tampón HEPES 25-50 mM, preferiblemente 50 mM ajustado a pH entre 6 y 7 , preferiblemente a 6,2 y papaína al 0,05-0,5%.

A continuación se describirán más detalladamente algunas realizaciones preferidas de la presente invención mediante ejemplos específicos, sin que la invención se limite a dichos ejemplos de ninguna manera.

EJEMPLO 1

Valoración de diferentes agentes reductores

Se preparó una solución para solubilizar membrana de cáscara de huevo a razón de 10 mg de membrana de cáscara de huevo/ml de disolución. Dicha solución comprendía un agente desnaturalizante, y más concretamente uno con propiedades detergentes y con carácter anfífilo tal como el SDS a una concentración del 0,5-5%. La solución también comprendía un agente reductor, para lo que se prepararon soluciones a una concentración

- de 100 mM-1 M de los siguientes agentes reductores: sulfito de sodio (Na_2SO_3), hidrosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), hidroximetanosulfonato de sodio ($\text{HOCH}_2\text{SO}_2\text{Na}$), metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) y ditioneitol (DTT), que se sometieron a prueba de manera sucesiva. Por último, se añadió un tampón apropiado para mantener el pH en función de la enzima que iba a usarse, con una concentración de 25-50 mM. Una vez ajustado el pH con un pH-metro al óptimo para cada enzima, se añadió a la disolución la enzima previamente preparada según la especificación del fabricante a una concentración del 1%, de tal manera que la concentración final de la enzima con respecto al total de la disolución era del 0,05-0,5%. Se procedió de igual manera con cada una de las enzimas utilizadas en el presente ejemplo.
- 10 Una vez mezclados y homogenizados todos los componentes, se incubó dicha mezcla a la temperatura de máxima actividad de cada enzima. Se valoró el nivel de hidrólisis tras 1, 12 y 24 horas de incubación y se compararon los resultados frente a un control realizado cuya única diferencia con las disoluciones problema era la ausencia de enzima.
- 15 En la siguiente tabla se muestran los resultados correspondientes a las distintas pruebas realizadas en el ejemplo 1.

ENZIMA	naturaleza	pH	Agente desnaturante	Agente reductor	% solubilizado	Tiempo (h)
Papaína	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	Na_2SO_3	0	24
Bromelina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	Na_2SO_3	0	24
Ficina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	Na_2SO_3	0	24
Proteasa K	Endopeptidasa Cisteín proteasa	7	SDS	Na_2SO_3	0	24
Pepsina	Endopeptidasa	4	SDS	Na_2SO_3	0	24

ENZIMA	naturaleza	pH	Agente desnaturante	Agente reductor	% solubilizado	Tiempo (h)
Papaína	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	0	24
Bromelina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	0	24
Ficina	Endopeptidasa Cisteín	6,2	SDS	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	0	24

	proteasa					
Proteasa K	Endopeptidasa Cisteín proteasa	7	SDS	Na ₂ S ₂ O ₄	0	24
Pepsina	Endopeptidasa	4	SDS	Na ₂ S ₂ O ₄	0	24

ENZIMA	naturaleza	pH	Agente desnaturante	HOCH ₂ SO ₂ Na	% solubilizado	Tiempo (h)
Papaína	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	HOCH ₂ SO ₂ Na	100	12
Bromelina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	HOCH ₂ SO ₂ Na	100	12
Ficina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	HOCH ₂ SO ₂ Na	0	24
Proteasa K	Endopeptidasa Cisteín proteasa	7	SDS	HOCH ₂ SO ₂ Na	0	24
Pepsina	Endopeptidasa	4	SDS	HOCH ₂ SO ₂ Na	0	24

ENZIMA	naturaleza	pH	Agente desnaturante	Agente reductor	% solubilizado	Tiempo (h)
Papaína	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	Na ₂ S ₂ O ₅	100	1
Bromelina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	Na ₂ S ₂ O ₅	100	1
Ficina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	Na ₂ S ₂ O ₅	50	24
Proteasa K	Endopeptidasa Cisteín proteasa	7	SDS	Na ₂ S ₂ O ₅	80	24
Pepsina	Endopeptidasa	4	SDS	Na ₂ S ₂ O ₅	0	24

ENZIMA	naturaleza	pH	Agente desnaturante	Agente	% solu-	Tiempo
--------	------------	----	---------------------	--------	---------	--------

			ralizante	reductor	bilizado	(h)
Papaína	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	DTT	100	1
Bromelina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	DTT	100	1
Ficina	Endopeptidasa Cisteín proteasa	6,2	SDS	DTT	50	24
Proteasa K	Endopeptidasa Cisteín proteasa	7	SDS	DTT	80	24
Pepsina	Endopeptidasa	4	SDS	DTT	0	24

Por lo tanto, a partir de los resultados anteriores puede concluirse que, de los distintos agentes reductores sometidos a prueba, tan solo tres (hidroximetanosulfonato de sodio, metabisulfito de sodio y DTT) podían permitir la hidrólisis de las enzimas sometidas a prueba en las condiciones descritas en un 100%, y más concretamente el metabisulfito de sodio y el DTT mostraron mejores resultados.

Con los hidrolizados obtenidos tras el uso del DTT y metabisulfito de sodio, se procedió a la cuantificación del colágeno y GAG. En el caso de los hidrolizados obtenidos con el DTT se observaron interferencias que impedían su correcta cuantificación. Por tanto, en realizaciones en las que se desea realizar la cuantificación precisa de los diversos componentes de la membrana de cáscara de huevo, es preferible el uso de metabisulfito de sodio como agente reductor.

EJEMPLO 2

Con el siguiente ejemplo se pretendió comprobar la concentración óptima de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) que va a emplearse, para lo que se emplearon papaína como enzima y distintas concentraciones de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Además, se procedió a valorar la necesidad o no del uso del agente desnaturizante SDS, para lo que se obvió su uso cuando se empleó la máxima concentración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, obteniéndose una ausencia completa de hidrólisis, tal como se demuestra en la tabla a continuación.

En concreto, se preparó una disolución para solubilizar 10 mg de membrana de cáscara de huevo/ml de disolución. Dicha disolución contenía únicamente metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) a 100 mM (1). Se prepararon otras tres disoluciones similares con un orden creciente de concentración de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 5 mM (2), 50 mM (3) y 100 mM (4), pero que contenían en este caso SDS al 0,5-5%, en tampón HEPES 50 mM ajustado con pH-metro a pH 6,2. Se comprobó que el rango de metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) óptimo para la presente invención es de entre 50 y 150 mM. Se añadió papaína previamente activada en disolución de cloruro de sodio 0,15 M de tal modo que la concentración final de la enzima en la mezcla era del 0,05-0,5%. Una vez mezclados y homogenizados todos los componentes, se incubó dicha mezcla a 38°C durante 12 h. Se evaluó el nivel de hidrólisis tras 12 horas de incubación y se compararon los resultados frente a un control realizado cuya única

diferencia con las disoluciones problema era la ausencia de enzima. Se obtuvo una disolución similar al control para las muestras 1 y 2, una disolución completamente transparente de color ámbar manifestando la desaparición total de la membrana de cáscara de huevo a disolver para la disolución 4, y un resultado intermedio para la disolución 3.

5 Los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla.

Papaína	(1) Na ₂ S ₂ O ₅ 100 mM	(2) SDS + Na ₂ S ₂ O ₅ 5 mM	(3) SDS + Na ₂ S ₂ O ₅ 50 mM	(4) SDS + Na ₂ S ₂ O ₅ 100 mM
% solubilizado	0	0	70	100

EJEMPLO 3

10 Con el fin de optimizar la cantidad de membrana que podía hidrolizarse con una concentración de papaína al 0,1%, se procedió a realizar distintas diluciones de la membrana a hidrolizar, obteniéndose los mejores resultados para una concentración de membrana de entre 20 y 150 mg/ml (aunque la invención también funciona en el rango de entre 5 y 155 mg/ml), y más concretamente de 70 mg/ml, tal como puede apreciarse en la tabla a continuación.

15 En concreto, se prepararon diferentes disoluciones con distinta cantidad de membrana de cáscara de huevo de manera que se obtuvieron unas concentraciones finales con respecto al volumen total de disolución de 20, 30, 40, 50, 70, 100 y 150 mg de membrana de cáscara de huevo/ml de disolución. La disolución contenía metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅) a 100 mM, SDS al 0,5-5% en tampón HEPES 50 mM ajustado con pH-
20 metro a pH 6,2. Posteriormente se añadió papaína al 1% previamente activada en disolución de cloruro de sodio 0,15 M de manera que la concentración de la enzima con respecto al volumen final de la mezcla era del 0,05-0,5%. Una vez mezclados y homogenizados todos los componentes, se incubó dicha mezcla a 38°C durante 12 h y se compararon los resultados frente a un control realizado cuya única diferencia con las disoluciones problema era la ausencia de enzima. Se obtuvo una disolución transparente de color ámbar cuyo color
25 se acentúa conforme aumenta la concentración de membrana, además de aumentarse la presencia de un precipitado que indica un menor nivel de hidrólisis.

Membrana, mg/ml	Papaína, %	Tiempo, h	% de hidrolización
20	0,1	12	100
30	0,1	12	100
50	0,1	12	100
70	0,1	12	100
100	0,1	12	90
150	0,1	12	80

EJEMPLO 4Determinación de glucosaminoglicanos (GAG) en membrana de huevo

Los GAG son unos de los componentes que se encuentran en mayor proporción en la membrana de huevo. La cantidad de efectos beneficiosos que pueden aportar los GAG en el organismo humano tras su ingesta se han descrito en innumerables ocasiones, por lo tanto resulta de vital importancia dar con una técnica que permita obtener unos resultados fidedignos y repetitivos. Uno de los métodos que más se utiliza para cuantificar el contenido de GAG de material orgánico y con mejores resultados es el método del carbazol cuya descripción se detalla según la Real Farmacopea Española, 2ª edición. 01/2002, 1472. Uno de los condicionantes del presente método es que las muestras a cuantificar han de ser solubles en agua. Dada la insolubilidad de la membrana de huevo, era requisito prioritario conseguir que la membrana de huevo pudiera solubilizarse en agua.

Con el fin de validar el método y antes de proceder a la cuantificación de los hidrolizados, se procedió a utilizar diferentes concentraciones (0,02, 0,04, 0,06 y 0,08 mg/ml) de un GAG conocido, el ácido hialurónico (AH). Los resultados así obtenidos mostraron que el método del carbazol realmente permitía cuantificar de manera fidedigna la presencia de un GAG como el AH en una disolución dado que el coeficiente de correlación que se obtuvo fue $r^2 = 0,9937$).

Una vez validada la técnica del carbazol, para poder medir los GAG en la membrana de huevo hidrolizada se procedió a cuantificar los GAG en los hidrolizados obtenidos con mejores resultados en el ejemplo 1 anteriormente descrito, en concreto aquellos que se habían obtenido utilizando como agente reductor el metabisulfito de sodio (A) y el DTT (B).

Se procedió de manera similar con ambos hidrolizados tal como se describe a continuación.

En primer lugar se procedió a preparar los siguientes reactivos: una disolución de 0,95 g de tetraborato de sodio en 100 ml de ácido sulfúrico concentrado, una disolución de 0,125 g de carbazol en 100 ml de etanol anhidro, y por último, una disolución madre de ácido D-glucurónico en 100 ml de agua.

Una vez se dispuso de los reactivos necesarios tal como se describió anteriormente, se diluyeron 100 μ l de cada uno de los hidrolizados A y B en 1000 μ l de agua. Se colocaron los tubos de ensayos en un baño de hielo y se añadió 1,0 ml de las diluciones problema A y B. Se añadieron a cada tubo 5 ml de la disolución previamente preparada de tetraborato de sodio mantenida en baño de hielo. Una vez cerrados los tubos de ensayo herméticamente con tapones de vidrio, se agitó el contenido y se colocaron en un baño termostatzado a 90°C durante 10 minutos. Posteriormente se enfriaron los tubos en un baño de hielo y por último se añadieron a cada tubo 200 μ l de disolución alcohólica de carbazol preparado previamente. Tras volver a tapar los tubos y agitar, volvieron a colocarse en el baño a 90°C durante 15 minutos y, tras enfriar a temperatura ambiente, se procedió a medir la absorbancia de las disoluciones problema A y B a 530 nm. A la vez que las muestras problemas, se realizó el mismo procedimiento con 4 muestras con concentraciones de 6,5, 20, 40 y 65 μ g/ml de ácido D-glucurónico, obtenidas a partir de la dilución madre para poder realizar una recta patrón.

Las muestras patrón y las obtenidas de la muestra problema A mostraron una coloración rosada, similar a la que se había obtenido anteriormente cuando se realizó la prueba de validación de la técnica utilizando el AH.

Sin embargo, la muestra problema B mostró un color marrón en la que fue imposible obtener resultados de absorbancia. Dado que la única diferencia de ambas muestras

problemas A y B era la presencia de un agente reductor diferente, se concluyó que el DTT causaba interferencias con los reactivos de la técnica del carbazol y por tanto se concluyó que el único agente reductor susceptible de ser usado para la hidrólisis de la membrana con vistas a su posterior cuantificación de GAG era el metabisulfito de sodio.

- 5 La técnica así empleada proporcionó un resultado de GAG de $5,08 \pm 0,4784$ μg de ácido glucurónico/mg de Ovomet (membrana de huevo obtenida por Eggnovo S.L.).

EJEMPLO 5

Determinación de colágeno en membrana de huevo.

10 El colágeno uno de los componentes mayoritarios de la membrana de cáscara de huevo. En muchos trabajos publicados se determinan los niveles de colágeno en la membrana de huevo, sin embargo, los distintos resultados muestran fluctuaciones que en cierta medida se deben a las diferentes técnicas de cuantificación que se emplean. Este hecho se debe a que todos ellos requieren la solubilización previa de la membrana para su posterior análisis, por lo tanto el nivel de hidrolización de la membrana para su solubilización
15 resulta un parámetro vital para que los valores que se obtengan de colágeno sean representativos de la realidad. En la actualidad existen métodos de cuantificación colorimétricos, como puede ser el método de Sircol[®], que aunque presenta como ventaja una gran rapidez de ejecución, su precisión siempre es menor que la que puede implicar un método basado en determinaciones por HPLC.

20 El método de cuantificación de colágeno propuesto se basa en el método de cuantificación de la hidroxiprolina (Hyp) según Hutson *et al.* 2003 (J. Chromatogr. B 791: 427-430), con algunas modificaciones. Los resultados obtenidos anteriormente por Yu-Hong Zhao y Yu-Jiechi (Biotechnology8 (2):254-258 (2009), Characterization of Collagen from Eggshell Membrane), que demuestra que el colágeno de la membrana de huevo es de tipo I,
25 se decide tomar como patrón para la determinación colágeno tipo I. Además, según Dziewiatkowski D. et al, 1972. ("Epimerization of trans-4-Hydroxi-L-proline to cis-4-Hydroxy-D-proline during acid Hydrolysis of collagen") se conoce que, al degradarse el colágeno, se obtienen dos isómeros de hidroxiprolina, L y D-Hyp.

30 Por todo ello y antes de validar el método, se procedió a inyectar en el HPLC patrones de L-Hyp, D-Hyp y prolina, provenientes de Sigma-Aldrich, los cuales se prepararon en una matriz a diferentes concentraciones para poder identificar los picos correspondientes a cada uno de los isómeros y de la prolina que se esperaban obtener.

35 Una vez determinados los picos característicos de los dos isómeros de la hidroxiprolina y de la prolina y antes de proceder a la cuantificación de los hidrolizados, se realizaron una serie de disoluciones con distintas concentraciones de colágeno de tipo I de cola de ratón adquirido de Sigma-Aldrich, obteniéndose el perfil cromatográfico de la degradación del colágeno.

40 Dado que con las pruebas realizadas hasta el momento la combinación de la disolución de hidrólisis formada por SDS, metabisulfito de sodio y papaína era la que mejores resultados había mostrado, se empleó una disolución así constituida y con una concentración de membrana a disolver de 10 mg/ml.

45 Posteriormente se tomaron 100 μl del hidrolizado así obtenido y se le añadieron 500 μl de HCl 6 N, tras homogenización se tomaron 400 μl a los que se les añadieron 3600 μl más de HCl 6 N. A esto se le añadieron 100 μl de sarcosina 2 mM y se mantuvo en estufa a 110°C durante 18 horas en tubos cerrados con su tapa. Una vez enfriados, se neutralizó con NaOH 6 N llevando el pH a 9,5. De esta disolución se tomaron 900 μl a los que se les añadieron 200 μl de tampón borato 0,7 M, pH 9,5, 100 μl de disolución de o-ftaldehído

(OPA), 100 µl del reactivo de yodoacetamida y 300 µl de reactivo de cloroformiato de 9-fluorenilmetilo (Fmoc-HCl), agitando con vórtex durante 10 segundos y dejando 1 minuto en reposo tras la adición de cada una de las disoluciones. Finalmente, se lavó con 2 ml de dietil éter tres veces, agitando en cada caso 30 segundos, obteniéndose en cada tubo dos fases claramente diferenciadas, una superior que es la fase orgánica y una inferior que es la fase acuosa. Se desechó la fase orgánica, y se tomó una parte de la fase acuosa que se inyectó en el HPLC.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Columna Xterra® C18, 5 µm, y dimensiones de 25 x 0,46 mm. Las fases empleadas fueron A: Buffer acetato al 3% a pH 4,3 y B: acetonitrilo; en una relación isocrática de 65/35 respectivamente a 1 ml/min de velocidad de flujo y con una temperatura de la columna de 25°C.

Se optimizaron los cromatogramas a 20 minutos usando un detector de fluorescencia a 265 nm de longitud de onda de excitación y sin filtro de emisión.

Los resultados así obtenidos mostraron el $35,31 \pm 4,8\%$ de colágeno presente en Ovomet (membrana de huevo obtenida por Egnovo S.L.).

En la técnica anterior se conocen los siguientes resultados, por ejemplo:

- patente US6176376 B1 - 10% de colágeno

- Yu-hong Zhao et al.2009. Characterization of collagen from eggshell membrane. Biotechnology, 8: 254-258 - 10% de colágeno.

Los presentes resultados son más elevados que los observados en la bibliografía para la membrana de huevo, lo que viene a demostrar, teniendo en cuenta que todos ellos se obtienen a partir de hidrolizados de membrana, que la hidrolización de la membrana obtenida por el método propuesto en esta patente es superior a la descrita en otras publicaciones.

EJEMPLO 6

Estudios *in vitro* de viabilidad celular y absorción del hidrolizado

Una vez cuantificados los principales componentes biológicos presentes en Ovomet, se diseñó un estudio *in vitro* para poder comprobar, por una parte, la no toxicidad de los hidrolizados obtenidos a partir de la técnica descrita en el presente documento, y, por otra parte, la tasa de absorción en seres humanos que tendrán dichos hidrolizados.

Para poder realizar ambos estudios, se utilizó un modelo celular Caco-2 que forman una monocapa tras un proceso de maduración. Para ello se procedió tal como se detalla a continuación:

Se sembraron las células a una densidad de 3×10^5 por inserto de 24 mm² y área de 4,67 cm² en filtros de membrana porosos (0,4 µm) de poliéster (PET) de 6 pocillos (Transwell 3450; Costar, Corning). Estos insertos disponen de dos compartimentos separados, uno apical y otro basal. Se sembraron las células en cada compartimento apical, disueltas en un volumen de 1,5 ml de medio de cultivo. Posteriormente, se añadieron 2,5 ml de medio de cultivo al compartimento basal.

Para que las células fueran creciendo en los insertos, se les añadió medio de cultivo fresco cada dos días, hasta que transcurrieron 21 días para que el crecimiento celular fuera el apropiado con el fin de lograr la correcta formación y maduración de las múltiples capas de células.

Una vez concluido el periodo de 21 días tras la siembra celular se procedió a comprobar si las monocapas celulares no presentaban huecos intercelulares que permitiesen el paso de cualquier sustancia entre la parte apical y basal, con el fin de garantizar que el paso de sustancia que iba a someterse a prueba se realizaba exclusivamente a través de las células y no a través de cualquier hueco que pudiera existir entre las mismas. Para ello, se midió la resistencia transepitelial (TER) empleando un ohmímetro Millicell (modelo ERS, Millipore Corp., Billerica MA; EE.UU.). Solo se tomaron como adecuadas aquellas monocapas celulares con unos datos de resistencia de entre 500-800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$.

Una vez finalizado el periodo de 21 días y comprobado el correcto estado de las monocapas celulares, se procedió a retirar el medio de cultivo y bañar las células en una disolución fisiológica denominada HBSS (solución salina equilibrada de Hank) suplementada con HEPES a 25 mM, a pH 7,4 (Kis O *et al.*, Pharm Res (2013) 30:1050–1064). Se produjo el hidrolizado que iba a someterse a prueba tal como se describe a continuación: 50 mg/ml de OVOMET, disuelto en HEPES 50 mM, SDS al 1% y metabisulfito de sodio 100 mM y bromelina al 0,1%, durante 12 horas en las condiciones anteriormente descritas en el ejemplo 1.

Análisis de la viabilidad celular mediante azul de tripano.

Una vez obtenido el hidrolizado, se realizaron diferentes disoluciones seriadas del hidrolizado en HBSS (1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000) que se incubaron con el cultivo celular a 37°C y un 5% de CO₂, durante 4 horas. Pasado este periodo de tiempo, se eliminó el medio de cultivo, se procedió a añadir 400 μl de tripsina que posteriormente se neutralizaron con 600 μl de PBS y suero fetal bovino al 2,5%. Tras realizar lavados sucesivos, se traspasaron las células a tubos Eppendorf que se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 300 μl de PBS y suero fetal bovino en las mismas concentraciones que en el caso anteriormente descrito.

Para analizar la viabilidad celular, se tomaron 50 μl de muestra y se mezclaron con 50 μl de azul de tripano al 4%. Se cargaron las muestras en una cámara de Bürker, se observaron al microscopio óptico y se contaron las células de 20 campos por muestra, diferenciando entre vivas y muertas.

Para elegir las diluciones óptimas que mostraban mejores tasas de viabilidad celular, se establecieron los siguientes criterios de selección:

- a- Que las células no se desprendiesen una vez puestas en contacto con las diluciones.
- b- Que en el recuento en la cámara de Bürker no hubiese más de un 10% de células muertas.
- c- Que las células observadas al microscopio presentasen una conformación adecuada (forma redondeada y bordes lisos).

Se observó que la viabilidad era superior al 90% en las diluciones de 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000, eligiéndose para el estudio las diluciones de 1:400, 1:600, 1:800.

Estudio de transporte y absorción

Una vez que se disponía de monocapas de células Caco-2 cuya correcta elaboración se había sometido a prueba tal como se describió anteriormente, se procedió a hacer una preincubación de las células. Para ello, se añadió una disolución de transporte a ambos

5 lados (tanto el lado apical como el lado basal) del cultivo celular durante 1 hora a 37°C y el 5% de CO₂. Una vez finalizada la preincubación, se eliminó la disolución de transporte y se añadió al compartimento apical la disolución que contenía el hidrolizado de membrana a distintas diluciones (1:400, 1:600 y 1:800) para su incubación a 37°C y con el 5% de CO₂, durante 90, 120, 150 y 180 minutos. En el último punto, se tomó además una muestra del compartimento apical. Se determinó la concentración de hidroxiprolina (Hyp) por HPLC en el lado basal, como indicador del transporte intestinal del hidrolizado de Ovomet.

10 En la siguiente tabla se recopilan los resultados del estudio de transporte. Dicha tabla presenta la razón correspondiente a las áreas cromatográficas de la Hyp obtenidas en las distintas diluciones y en los distintos tiempos. Los valores subrayados son los valores de Hyp correspondientes a la disolución de transporte con las distintas diluciones de hidrolizado de Ovomet.

Disolución OVOMET, 1/400	<u>0,33406326</u>
Tiempo, min.	
90	0,02141620
120	0,1265950
150	0,04080866
180	0,03207032
Disolución OVOMET, 1/600	<u>0,33406326</u>
Tiempo, min.	
90	n.c.
120	0,03725867
150	0,02343651
180	0,01011769
Disolución OVOMET, 1/800	<u>0,20823490</u>
Tiempo, min.	
90	0,02665078
120	0,01648812
150	0,01379862
180	0,00788849

15 Con estos resultados, se calculó el porcentaje acumulado, considerando los valores relativos a las distintas concentraciones de hidrolizado.

Tiempo	Dilución de hidrolizado de Ovomet		
	1/400	1/600	1/800
	% de disolución hidrolizado Ovomet acumulado		
	100%	65,40%	50%
90	6,41	nc	6,39
120	10,20	11,52	10,35
150	22,41	18,77	13,67
180	32,01	21,90	15,56

Con estos valores se realizaron regresiones lineales a partir del porcentaje de disolución de Ovomet acumulado, observándose pendientes crecientes cuanto mayor es la concentración de la disolución de hidrolizado testada (véase la figura 1).

- 5 Una vez conocidos estos datos, es necesario conocer el parámetro denominado “coeficiente de permeabilidad aparente” (P_{app}), puesto que existen varios modelos que relacionan el logaritmo de P_{app} con la absorción en seres humanos. Para el cálculo de P_{app} , se utilizó la siguiente ecuación: $P_{app} = Q/A \times C_i$, donde Q es la pendiente de las rectas de regresión anteriormente calculadas (cantidad acumulada frente al tiempo), A es la sección de pocillos Transwell y C_i es la concentración en el lado apical. Los datos así calculados se muestran en la siguiente tabla.
- 10

Dilución	P_{app} (cm/s)	Log P_{app}
1/400	$1,606 E^{-05}$	-4,79
1/600	$1,604 E^{-05}$	-4,79
1/800	$7,495 E^{-06}$	-5,12

- Conocidos los valores del Log P_{app} , tal como se comentó anteriormente, pueden correlacionarse con la fracción absorbida en seres humanos tras la administración oral expresada en % de la dosis del producto administrado obtenida en 4 laboratorios diferentes, véase la figura 2.
- 15

En función de los diferentes modelos comentados, se obtuvieron los siguientes resultados de absorción.

Modelo	% de absorción
Artursson <i>et al</i>	100
Cogburn <i>et al</i>	95-100
Rubas <i>et al</i>	93-100
Stewart <i>et al</i>	45-65

Los modelos comentados se conocen de las siguientes fuentes:

Artursson et al 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (caco-2) cells. "Biochemical and biophysical research communications 175 (3): 880-5.

5 Coburn et al (1991)." A model of human small intestinal absorptive cells. A. Transport barrier."Pharmaceutical research 8 (2): 210-6.

Rubas et al. (1996). "Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestine tissue."Journal of pharmaceutical science 85 (2):165-9

10 Stewart et al. (1995). "Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. "Pharmaceutical research 12(5):693-9

Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente con referencia a determinadas realizaciones preferidas, el experto en la técnica entenderá que pueden aplicarse diversas modificaciones y variaciones sin por ello apartarse del alcance de protección definido por las reivindicaciones adjuntas. En concreto, en función de restricciones de aplicaciones concretas (costes, rendimiento buscado, etc.) así como de los fines de la aplicación (obtención de componentes útiles en la industria, cuantificación de componentes constituyentes de la membrana, etc.) podrán emplearse distintos agentes reductores, agentes desnaturizantes, tampones y enzimas, así como distintas cantidades de los mismos.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de hidrolización de membrana de cáscara de huevo, que comprende la etapa de tratar una cantidad adecuada de membrana de cáscara de huevo en una solución que contiene un agente desnaturalizante, un agente reductor, un tampón y una enzima.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el agente desnaturalizante tiene propiedades detergentes y carácter anfífilo.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por que el agente desnaturalizante es un tensioactivo aniónico.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que el agente desnaturalizante se selecciona del grupo constituido por laurilsulfato de sodio (SDS) y taurocolato de sodio.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el agente reductor se selecciona del grupo constituido por hidroximetanosulfonato de sodio, metabisulfito de sodio y DTT.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que el agente reductor se selecciona del grupo constituido por metabisulfito de sodio y DTT.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que el agente reductor es metabisulfito de sodio.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la enzima es una endopeptidasa del grupo de las cisteín proteasas.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la endopeptidasa se selecciona del grupo constituido por papaína y bromelina.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que comprende la etapa de tratar una cantidad de membrana de cáscara de huevo en un rango de entre 5 y 155 mg/ml, preferiblemente de entre 20 y 150 mg/ml y más preferiblemente de 70 mg/ml en una disolución que contiene metabisulfito de sodio en un rango de entre 50 y 150 mM, preferiblemente de 100 mM, SDS al 0,5-5% en tampón HEPES 25-50 mM, preferiblemente 50 mM ajustado a pH entre 6 y 7, preferiblemente 6,2, añadiéndose a dicha disolución una disolución de papaína al 1% en cloruro de sodio en un rango de 0,05 a 0,5 M, preferiblemente 0,15 M hasta que la concentración final de papaína en la disolución es de 0,05-0,5%.
11. Composición de hidrolización de membrana de cáscara de huevo que comprende un agente desnaturalizante, un agente reductor, un tampón y una enzima.
12. Composición según la reivindicación 11, caracterizada por que el agente desnaturalizante tiene propiedades detergentes y carácter anfífilo.
13. Composición según la reivindicación 12, caracterizada por que el agente desnaturalizante es un tensioactivo aniónico.
14. Composición según la reivindicación 13, caracterizada por que el agente desnaturalizante se selecciona del grupo constituido por laurilsulfato de sodio (SDS) y taurocolato de sodio.
15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizada por que el agente reductor se selecciona del grupo constituido por hidroximetanosulfonato de

sodio, metabisulfito de sodio y DTT.

16. Composición según la reivindicación 15, caracterizada por que el agente reductor se selecciona del grupo constituido por metabisulfito de sodio y DTT.
- 5 17. Composición según la reivindicación 16, caracterizada por que el agente reductor es metabisulfito de sodio.
18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, caracterizada por que la enzima es una endopeptidasa del grupo de las cisteín proteasas.
19. Composición según la reivindicación 18, caracterizada por que la endopeptidasa se selecciona del grupo constituido por papaína y bromelina.
- 10 20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, caracterizada por que comprende metabisulfito de sodio en un rango de entre 50 y 150 mM, preferiblemente de 100 mM, SDS al 0,5-5% en tampón HEPES 25-50 mM, preferiblemente 50 mM ajustado a pH entre 6 y 7 , preferiblemente a 6,2 y papaína al 0,05-0,5%.

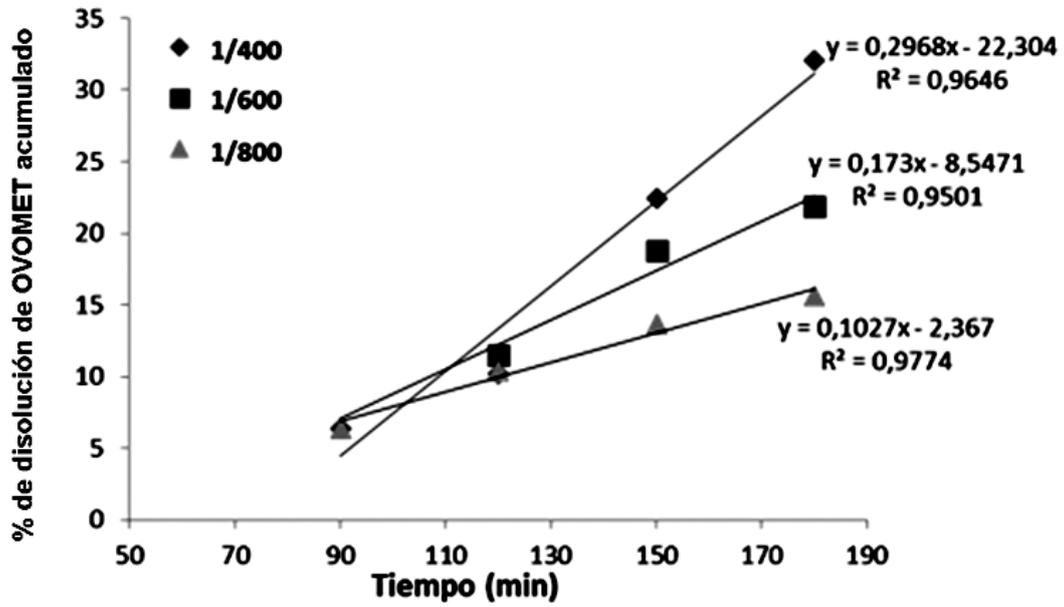


FIG. 1

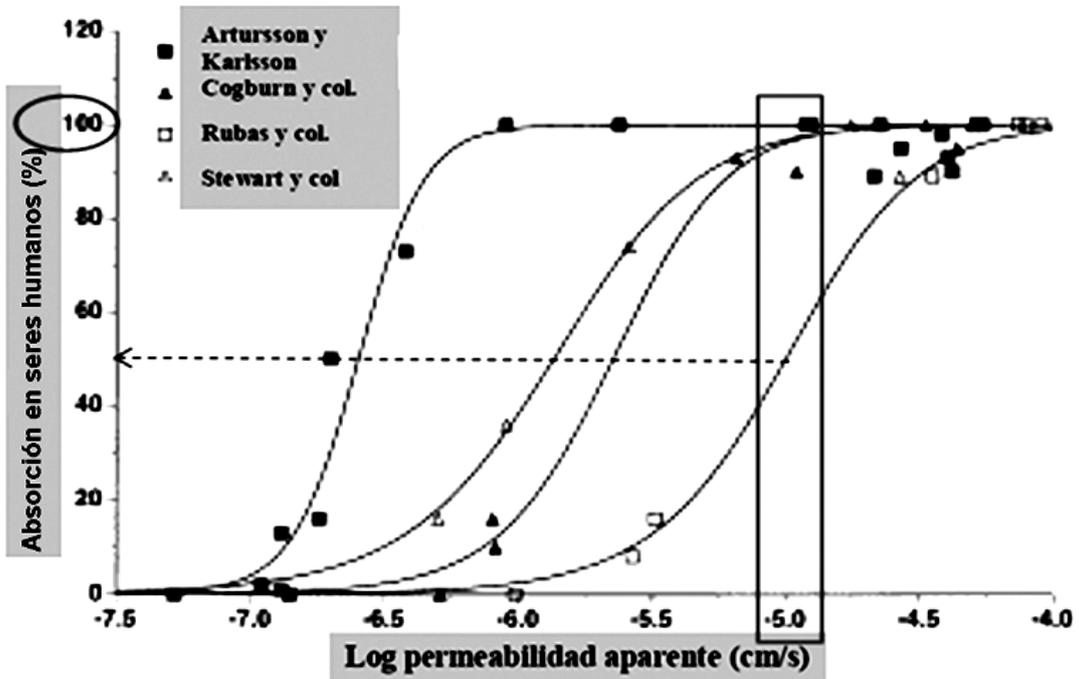


FIG. 2