

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 216**

51 Int. Cl.:

A23J 1/00 (2006.01)

A23J 1/10 (2006.01)

A23K 40/00 (2006.01)

A23K 10/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2014 E 14161697 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2783575**

54 Título: **Procedimiento de descontaminación de productos animales**

30 Prioridad:

27.03.2013 FR 1352773

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

19.09.2017

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE ET
AUX ÉNERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment "Le Ponant D", 25, rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**COMOY, EMMANUEL;
WODLING, PASCAL y
DESLYS, JEAN-PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 633 216 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

Procedimiento de descontaminación de productos animales

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a un procedimiento de descontaminación de productos animales, principalmente de subproductos animales destinados a la preparación de proteínas animales transformadas (PAT), en particular frente al prion.

Antecedentes de la técnica

- 10 Francia produce cada año aproximadamente 3 millones de toneladas de desechos animales, desde los desechos de carnicería (clasificados C3 y procedentes de alimentos propios de la alimentación humana) hasta cadáveres de animales recuperados de la granja (C2) y los despojos con riesgo de prion (C1).

Estos subproductos animales se pueden utilizar para la producción de harinas animales (harinas de carnes y de huesos) en adelante llamados proteínas animales transformadas (PAT), que representan 700.000 toneladas por año (después de recuperación de las grasas y evaporación del agua) en Francia. Estas cifras se multiplican por 5 a nivel de Europa.

- 15 Sin embargo, estas proteínas de muy alto valor añadido son difíciles de valorizar desde la crisis de las vacas locas, aun cuando esta enfermedad prácticamente ha desaparecido en Francia y más ampliamente a nivel europeo. En efecto, los procedimientos habituales de transformación de los subproductos animales en PAT, que implican generalmente trituración, calentamiento a aproximadamente 80°C, un prensado para eliminar la grasa y finalmente un secado, no permiten destruir el prion. Debido a esta subutilización de los PAT, el déficit de proteínas de Europa ha aumentado en beneficio principalmente de la importación de soja genéticamente modificada. Así se estimaba en 20
20 2011 que 70% del consumo de la Unión Europea (es decir 42 millones de toneladas de materias primas ricas en proteínas vegetales en 2009), esencialmente harinas de soja, eran importadas, en particular para la alimentación animal. Aún más, según informes del parlamento europeo, estas producciones importadas no están sometidas a las mismas restricciones medioambientales, sanitarias y de reglamentación sobre los organismos genéticamente
25 modificados (OGM) que las producciones europeas.

Por otra parte, el desarrollo de la piscicultura, que parece indispensable para alimentar a las poblaciones en los años venideros, se encuentra con dificultades de aprovisionamiento de proteínas de calidad y la situación actual lleva a una sobrepesca de pescados salvajes transformados en harinas de pescado (20 millones de toneladas de pescados salvajes por año) para proporcionar alimentos adaptados.

- 30 En este contexto, una revalorización innovadora de los subproductos animales que implican su descontaminación de los priones eventualmente presentes les permitiría pasar del estatuto de desechos al de materias primas de alto valor añadido.

- 35 Sin embargo, los procedimientos habituales de descontaminación de priones, tales como una inmersión en una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y autoclave a 121°C durante 30 minutos (recomendación de la Organización Mundial de la Salud) o los definidos en el Reglamento (CE) nº 1774/2002 del parlamento europeo y del consejo del 3 de octubre de 2002 estableciendo reglas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano, están mal adaptados al tratamiento de los subproductos animales en el marco de la producción de PAT ya que inducen una degradación de sus calidades organolépticas y nutricionales.

- 40 Así, Brown *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6093-6097 han tenido que proponer un procedimiento adaptado a la preparación PAT que implica un calentamiento a temperaturas de 121-137°C y pulsaciones a ultra-alta presión (al menos 690 MPa), lo que hace que este procedimiento sea difícilmente industrializable.

La solicitud de patente internacional WO02/39826 propone un procedimiento que comprende una etapa de tratamiento alcalino a una temperatura comprendida entre 55°C y 99°C y una duración comprendida entre 1 y 4 horas.

- 45 Queda por lo tanto definir un procedimiento industrializable de descontaminación de subproductos animales con vistas a la producción de PAT, que combina principalmente eficacia frente a los priones y otros agentes patógenos previstos en estos productos, manteniendo las calidades nutricionales y organolépticas necesarias para su utilización posterior.

Resumen de la invención

- 50 La presente invención es resultado de la demostración inesperada, por los inventores, de que la combinación consecutiva de un tratamiento ligeramente alcalino mediante una base débil, preferentemente una sal de carbonato, y un tratamiento térmico a menos de 121°C permite descontaminar preparaciones que contienen priones a la vez que es compatible con la preparación de PAT que tienen cualidades organolépticas y nutricionales convenientes.

Sin querer estar ligados a una teoría particular, los inventores piensan que la base débil combina una acción desestabilizadora del prion, al menos por el pH alcalino que proporciona, con una acción de hidratación del producto animal. La agitación molecular consecutivamente inducida por un calentamiento moderado conduce entonces a una degradación de los priones.

5 Así la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento descontaminante de productos animales que comprende las siguientes etapas:

- una extracción de las grasas de dichos productos animales, previamente a la primera etapa;

- una primera etapa de puesta en contacto de dichos productos animales desgrasados con al menos una base débil que tenga un pKa comprendido entre 9 y 12 para formar una mezcla;

10 - una segunda etapa que comprende al menos un calentamiento principal de la mezcla a una temperatura en el interior de al menos 100°C e inferior a 121°C durante un tiempo de 5 a 15 minutos, siendo dicho calentamiento principal un calentamiento húmedo; en el que el pH de la mezcla a la salida de la segunda etapa es superior o igual a 9 e inferior a 11.

15 La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento descontaminante de productos animales que comprende las siguientes etapas:

- una extracción de las grasas de dichos productos animales, simultáneamente a la primera etapa de puesta en contacto de dichos productos animales con al menos una base débil que tenga un pKa comprendido entre 9 y 12 para formar una mezcla;

20 - una segunda etapa que comprende al menos un calentamiento principal de la mezcla a una temperatura en el interior de al menos 100°C e inferior a 121°C durante un tiempo de 5 a 15 minutos, siendo dicho calentamiento principal un calentamiento húmedo; en el que el pH de la mezcla a la salida de la segunda etapa es superior o igual a 9 e inferior a 11.

25 El calentamiento principal de la segunda etapa es un calentamiento húmedo. La noción de calefacción húmeda es bien conocida por el experto en la técnica. Se trata preferentemente de un calentamiento en el curso del que se limita la evaporación de agua de la mezcla, más preferentemente de un calentamiento realizado con saturación de vapor de agua.

La presente invención se refiere también a un procedimiento de tratamiento descontaminante de productos animales que comprende las siguientes etapas:

- una extracción de las grasas de dichos productos animales, previa o simultáneamente a la primera etapa;

30 - una primera etapa de puesta en contacto de dichos productos animales con al menos una base débil que tenga un pKa comprendido entre 9 y 12 para formar una mezcla; la cantidad de la base débil y de las formas ácidas o básicas conjugadas de la base débil eventualmente puestas en contacto con el producto animal conjuntamente a la base débil, referida al volumen de la mezcla, es inferior a 1 mol·L⁻¹ y de al menos 50 mmol·L⁻¹;

35 - una segunda etapa que comprende al menos un calentamiento principal de la mezcla a una temperatura en el interior de al menos 100°C e inferior a 121°C durante un tiempo de 5 a 15 minutos.

40 La presente invención se refiere también a (i) un procedimiento de obtención de proteínas animales transformadas (PAT), que comprende la realización del procedimiento de tratamiento descontaminante definido anteriormente, (ii) las PAT susceptibles de ser obtenidas por la realización del procedimiento de obtención de PAT según la invención, y (iii) la utilización de las PAT susceptibles de ser obtenidas por la realización del procedimiento según la invención a modo de fertilizante o para alimentar animales, principalmente peces.

Descripción detallada de la invención

Producto animal

Un "producto animal" en el sentido de la invención comprende, o está formado por, todo o parte de un cadáver animal así como las materias secretadas o excretadas por un animal.

45 Preferentemente, el producto animal según la invención es un subproducto animal.

50 Un "subproducto animal" en el sentido de la invención designa un producto animal según la invención, propio o indebido para el consumo humano, pero no destinado al consumo humano, sea de acuerdo al respeto de una legislación o por razones comerciales. Así, a modo de ejemplo, un subproducto animal según la invención comprende, o consiste en, músculo, vísceras, piel, pezuñas, cuernos, plumas, huesos, cascarones, chicharrones, sangre, leche, óvulos, embriones, esperma, biomasa, estiércol, residuos de metanización o mezclas de éstos.

Los animales de los que proceden los productos o subproductos animales en el sentido de la invención pueden ser animales de producción, tales como los bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, pájaros o incluso los pescados, u otros animales, tales como caballos, animales de compañía, artrópodos, principalmente insectos o crustáceos, reptiles, o moluscos.

- 5 Preferentemente, el producto animal se tritura previamente a la primera etapa (antes o después de la extracción de las grasas) de forma que se obtenga un tamaño de partículas, o granulometría, medio inferior a 100 mm, 50 mm ó 30 mm.

Tratamiento descontaminante

- 10 Tal como se entiende aquí, un "tratamiento descontaminante" o una "descontaminación" designa la reducción de la cantidad de agentes patógenos eventualmente presentes en el producto animal. En particular, el "tratamiento descontaminante" según la invención consiste preferentemente en reducir en al menos 80%, 90%, 95%, 99%, 99,9%, 99,99% ó 99,999% la cantidad de agente patógeno presente en el producto que se va a tratar según la invención.

- 15 Tal como quedará claro para el experto en la técnica, el procedimiento de tratamiento descontaminante según la invención no se aplica al cuerpo de un humano o de un animal vivo.

- Los "agentes patógenos" según la invención pueden ser de cualquier tipo y se seleccionan principalmente en el grupo formado por un prion, un virus, una bacteria, un hongo, un protozoo, y una espora de hongo o de bacteria. Preferentemente, el agente patógeno según la invención es un prion, una espora de bacteria, principalmente del género *Bacillus*, o una micobacteria. De forma particularmente preferida, el agente patógeno según la invención es un prion. Cuando el agente patógeno según la invención es un prion, la proteína constitutiva del prion, o PrP, se encuentra esencialmente en su forma resistente, patógena, PrPres.
- 20

Base débil (o disolución alcalina)

- Una "base" según la invención designa un compuesto susceptible de captar un protón (H⁺) y/o de liberar un ion hidroxilo (OH⁻) en una disolución que lo contiene. Una base se dice débil si, cuando se añade a una disolución, capta significativamente menos iones H⁺ y/o genera significativamente menos iones OH⁻ que la cantidad de base que se añade a la disolución, dicho de otra forma la base débil no se disocia completamente en disolución. Así, la base débil según la invención debe distinguirse bien de una base fuerte, tal como la potasa (KOH) o la sosa (NaOH). Por otra parte, la base débil según la invención tiene un pKa comprendido entre 9 y 12, es decir superior o igual a 9 e inferior o igual a 12. Preferentemente, el pKa es inferior o igual a 12, 11,5 u 11. Preferentemente también, el pKa es superior o igual a 9, 9,5 ó 10. Tal como se entiende aquí, la base débil según la invención puede tener una o varias funciones básicas. Cuando la base débil según la invención comprende varias funciones básicas, el pKa según la invención es el de al menos una de ellas. Tal como quedará claro para el experto en la técnica los valores de pKa según la invención son preferentemente los medidos en las condiciones de laboratorio de temperatura y de presión, principalmente a una temperatura de 20°C a 25°C y a presión atmosférica, en particular a una presión de aproximadamente 1 bar.
- 25
- 30
- 35

La base débil puede ponerse en contacto sola o asociada con al menos una de las formas ácidas o básicas conjugadas.

- La base débil según la invención puede ser de cualquier naturaleza. Sin embargo, se prefiere que la base débil según la invención sea una sal de carbonato, principalmente de carbonato de sodio o de carbonato de potasio. Preferentemente, y como comprenderá bien el experto en la técnica, la base débil según la invención no es carbonato de calcio. Tal como se entiende aquí, una sal de carbonato designa una sal de CO₃²⁻, una sal de HCO₃⁻, o una combinación de las dos.
- 40

- Preferentemente, la cantidad de base débil y de las formas ácidas o básicas conjugadas de la base débil eventualmente puestas en contacto con el producto animal conjuntamente con la base débil, referida al volumen de la mezcla, es inferior a 1 mol·L⁻¹ o 0,5 mol·L⁻¹.
- 45

Preferentemente también, la cantidad de base débil y de las formas ácidas o básicas conjugadas de la base débil eventualmente puestas en contacto con el producto animal conjuntamente con la base débil, referida al volumen de la mezcla, es de al menos 50 mmol·L⁻¹, 100 mmol·L⁻¹, 200 mmol·L⁻¹, 300 mmol·L⁻¹ o 400 mmol·L⁻¹, más preferentemente de al menos 100 mmol·L⁻¹

- Tal como se entiende aquí, la cantidad de base débil y de las formas ácidas o básicas conjugadas de la base débil eventualmente puestas en contacto con el producto animal conjuntamente con la base débil designa la cantidad de la totalidad de las formas ácido-básicas de la base débil. Por ejemplo, cuando la base débil es una sal de carbonato, la cantidad de base débil y de las formas ácidas o básicas conjugadas de la base débil eventualmente puestas en contacto con el producto animal conjuntamente con la base débil designa la suma del número de moles de CO₃²⁻, de HCO₃⁻, y de H₂CO₃ puestos en contacto con el producto animal referido al volumen de la mezcla.
- 50
- 55

En un modo de realización particular de la invención, la base débil se aporta en forma de polvo.

5 En otro modo de realización particular de la invención, la base débil se aporta en forma de disolución. Una "disolución" según la invención es una disolución acuosa. En este caso la disolución de base débil presenta preferentemente un pH de al menos 9,5, 10, 10,5, 11 u 11,5. Preferentemente también, la disolución presenta un pH inferior a 13, 12,5 ó 12. Por otra parte, se prefiere que el volumen de la disolución de base débil según la invención represente de 1% (volumen/volumen o volumen/masa) a 33% (volumen/volumen o volumen/masa) del volumen de la mezcla según la invención.

10 Tal como se entiende aquí, el pH se mide en las condiciones de laboratorio de temperatura y de presión, principalmente a una temperatura de 20°C a 25°C y a la presión atmosférica, en particular a una presión de aproximadamente 1 bar.

15 El experto en la técnica sabe perfectamente preparar una disolución de una concentración dada de una base débil a un pH particular. Según la base débil y el pH que se pretende, se puede añadir a la disolución la base débil en su forma básica y/o ácida (es decir habiendo fijado un protón) y eventualmente ajustar el pH por la adición de una base fuerte, tal como la potasa (KOH) o la sosa (NaOH). Así, cuando la base débil según la invención es una sal de carbonato, la primera disolución se puede preparar añadiendo Na₂CO₃, o K₂CO₃, y/o NaHCO₃, o KHCO₃, y eventualmente ajustando el pH por medio de potasa y/o sosa.

Extracción de las grasas

20 La extracción de las grasas según la invención comprende preferentemente una etapa de calentamiento a una temperatura inferior a 100°C, principalmente de 75°C a 85°C, eventualmente en presencia de agentes que facilitan la extracción de grasas, tales como agentes ácidos, seguida de un prensado. Según la invención, esta extracción de las grasas puede tener lugar previamente a la primera etapa o simultáneamente a la primera etapa, pudiendo presentar este último caso ventajas industriales.

Primera etapa

25 Preferentemente, la mezcla se incuba durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 ó 30 minutos antes de la realización de la segunda etapa. Se prefiere también que la primera etapa tenga una duración de menos de dos horas, más preferiblemente de menos de una hora.

30 Por otra parte, la temperatura de incubación de la mezcla antes de la realización de la segunda etapa preferentemente es inferior a 50°C, 45°C, 40°C, 30°C. Preferentemente también, la temperatura de incubación de la mezcla antes de la realización de la segunda etapa es superior preferentemente a 10°C o 15°C. Así, de forma particularmente preferida la incubación de la mezcla antes de la realización de la segunda etapa se efectúa a temperatura ambiente. Como quedará claro para el experto en la técnica la temperatura ambiente puede variar en función de la región geográfica en la que se realice, de la estación o de la hora del día. Sin embargo, en una definición particular según la invención, la expresión "temperatura ambiente" apunta preferentemente a temperaturas entre 18°C a 25°C.

35 Por otra parte, cuando la primera etapa comprende una extracción de grasas, y como el experto en la técnica comprenderá bien, la temperatura de incubación puede aumentarse hasta una temperatura superior a 50°C, pero inferior a 100°C, y preferentemente de 75°C a 85°C. Además, cuando la primera etapa comprende una extracción de las grasas, la puesta en contacto de la base débil según la invención con el producto animal puede también tener lugar en totalidad antes de la extracción de las grasas, en totalidad en el transcurso de la extracción de las grasas, o incluso en parte antes, después y eventualmente durante la extracción de las grasas.

40 De forma preferida también, la primera etapa se lleva a cabo a presión atmosférica, es decir a aproximadamente 1 bar.

Segunda etapa

45 La segunda etapa del procedimiento de tratamiento descontaminante, comprende un calentamiento principal a una temperatura en el interior de al menos 100°C, preferentemente a una temperatura de al menos 105°C, 110°C ó 115°C e inferior a 121°C durante un tiempo de 5 a 15 minutos.

El experto en la técnica sabe bien medir la temperatura "en el interior" es decir en el seno de la mezcla. Esto se puede hacer, por ejemplo, sumergiendo una sonda de temperatura en la mezcla, de forma que se asegure que esencialmente toda la mezcla alcanza la temperatura pretendida.

50 Por otra parte, se prefiere que el calentamiento principal de la segunda etapa tenga una duración de 8 a 12 minutos.

Tal como comprenderá bien el experto en la técnica, la segunda etapa puede comprender otros calentamientos adicionales además del calentamiento principal. Puede tratarse especialmente de etapas con una temperatura inferior a 100°C antes de alcanzar la temperatura de calentamiento principal.

Asimismo, en un modo de realización preferido de la invención, el calentamiento principal está seguido de al menos un calentamiento adicional a una temperatura superior o igual a 121°C, principalmente a una temperatura de 131°C a 138°C. El calentamiento adicional tiene preferentemente una duración de 1 minuto a 20 minutos, más preferentemente de 1 minuto a 18 minutos.

- 5 En otro modo de realización preferido de la invención, el procedimiento de la invención no comprende calentamiento adicional a una temperatura superior o igual a 121°C.

Por otra parte, se prefiere que el procedimiento de tratamiento descontaminante según la invención se lleve a cabo en condiciones de calentamiento tales que la cantidad de agua extraída del producto animal sea inferior a 20% (en g por 100 g), más preferentemente inferior a 15% (en g por 100 g) de la masa del producto animal puesto en contacto con la base débil en la primera etapa. Preferentemente, el eventual volumen de agua aportado por una base débil en disolución según la invención no se contabiliza en el cálculo de este porcentaje, es decir, que la cantidad de agua extraída del producto animal se refiere a la cantidad de agua presente en el producto animal antes de la puesta en contacto de una base débil en disolución según la invención con el producto animal.

10 Por otra parte, de forma preferida también, la primera etapa se lleva a cabo a una presión de al menos la presión atmosférica y de como máximo de 2 bares, más preferentemente a la presión atmosférica, es decir aproximadamente 1 bar.

El pH de la mezcla a la salida de la segunda etapa es superior o igual a 9 e inferior a 11, más preferiblemente superior o igual a 9,5, e inferior o igual a 10,5.

20 Tal como se entiende aquí, el pH se mide en las condiciones de laboratorio de temperatura y de presión, principalmente a una temperatura de 20°C a 25°C y a la presión atmosférica, en particular a una presión de aproximadamente 1 bar.

Homogeneización de la mezcla

Por otra parte, tal como quedará claro para el experto en la técnica, preferentemente la mezcla se homogeneiza, por ejemplo por agitación o amasado.

Procedimiento de obtención de PAT

Los procedimientos de obtención de proteínas animales transformadas (PAT) a partir de productos animales, principalmente de subproductos animales, son bien conocidos por el experto en la técnica. Estos procedimientos comprenden normalmente una etapa de trituración del producto animal, principalmente del subproducto animal, seguida de una etapa de extracción de grasa, por calentamiento moderado, principalmente a aproximadamente 30 80°C, y prensado, luego generalmente se seca el producto animal triturado y desgrasado obtenido, por ejemplo por extrusión, para dar proteínas animales transformadas. El procedimiento de tratamiento descontaminante según la invención tiene lugar simultáneamente o después de la etapa de extracción de grasa, en el producto animal triturado, y antes de la etapa de secado.

35 En un modo de realización preferido de la invención, el procedimiento de obtención de PAT según la invención se realiza a partir de productos animales de categorías 1, 2 ó 3 en el sentido del Reglamento (CE) nº 1774/2002 del parlamento europeo y del consejo del 3 de octubre de 2002, principalmente a partir de productos animales de categoría 1, en particular con riesgo de prion.

40 A este respecto, se prefiere que cuando las PAT según la invención se obtengan a partir de productos animales de categorías 1, 2 ó 3 en el sentido del Reglamento (CE) nº 1774/2002 del parlamento europeo y del consejo del 3 de octubre de 2002, principalmente a partir de productos animales de categoría 1, en particular con riesgo de prion, entonces se utilicen como fertilizantes.

45 En otro modo de realización preferido de la invención, el procedimiento de obtención de PAT según la invención se realiza a partir de insectos, principalmente alimentados con productos animales de categorías 1, 2 ó 3 en el sentido del Reglamento (CE) nº 1774/2002 del parlamento europeo y del consejo del 3 de octubre de 2002, principalmente a partir de productos animales de categoría 1, en particular con riesgo de prion.

A este respecto, se prefiere que cuando las PAT según la invención se obtengan a partir de insectos, principalmente alimentados con productos animales de categorías 1, 2 ó 3 en el sentido del Reglamento (CE) nº 1774/2002 del parlamento europeo y del consejo del 3 de octubre de 2002, principalmente a partir de productos animales de categoría 1, en particular con riesgo de prion, entonces se utilicen para alimentar pescados.

50 La invención se detallará de forma no limitativa por medio de las figuras y ejemplos que siguen.

Descripción de las figuras

Figura 1

La figura 1 representa la cantidad de PrPres, identificada por transferencia de Western, extraída de un macerado de cerebro de hámster infectado por la cepa 263K puesta en contacto con el agua (pista 1), una disolución de carbonato/bicarbonato pH = 11 (pista 2), una disolución de sosa 5M (pista 3) y una disolución de sosa 0,5M (pista 4), y sometido a un calentamiento de 5 minutos a 60°C, y luego 3 minutos a 115°C a 10 bares de presión.

Figura 2

La figura 2 representa la cantidad de PrPres, identificada por transferencia de Western, extraída de un macerado de cerebro de hámster infectado por la cepa 263K puesta en contacto con concentraciones variables de una disolución de carbonato/bicarbonato pH = 11 (de 10 a 500mM), incubados a temperatura ambiente durante 20 minutos, calentados a 100°C durante 2 minutos, y luego a 115°C durante 10 minutos.

Figura 3

La figura 3 representa la cantidad de PrPres, identificada por transferencia de Western, en ensayos que comprenden una etapa previa (ensayo 1) o simultáneamente a la primera etapa (ensayo 2) de desgrasado de los productos animales.

La pista 1 corresponde a un testigo negativo (tratamiento de la muestra con agua); la pista 2 ilustra los resultados obtenidos en el caso de una extracción de las grasas previamente a la primera etapa de puesta en contacto con una base débil (Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 11 ó C11); las pistas 3 y 4 corresponden a un procedimiento según la invención que lleva a cabo una extracción de las grasas simultáneamente a la primera etapa.

EJEMPLOS

Los datos experimentales se han generado por medio de modelos *in vitro* (investigación de la PrPres, marcador específico de las enfermedades con prion), y por medio de bio-ensayos (inoculación al animal de laboratorio) con el fin de aumentar la sensibilidad del análisis por una parte, y para obtener respuestas en términos de infecciosidad por otra parte. Teniendo en cuenta la influencia que puede tener el entorno orgánico de los priones (efecto tampón, protección en caso de cocción), los estudios se han realizado sobre extractos de cerebro más o menos concentrados, pero también en presencia de matriz animal (carne), para imitar lo mejor posible la materia prima de interés, es decir los subproductos animales (SPA).

Materiales y métodos

Modelo de infección con prion

La mayoría de los estudios se han realizado en el modelo de infección experimental de hámster infectado por la cepa de tembladera 263K (Kimberlin & Walker (1977) *J. Gen. Virol.* 34: 295-304). Este modelo rápido (mortalidad al cabo de 80 días después de inoculación de una carga de 10⁸ unidades infecciosas) presenta la ventaja de un título infeccioso alto, y un espectro de resistencia considerado alto. Esta cepa se utiliza como modelo de referencia para los estudios de inactivación de priones.

Los estudios *in vivo* se han doblado en dos modelos de ratones transgénicos:

- el primer modelo se basa en la inoculación de una cepa de tembladera ovina adaptada al ratón transgénico que sobreexpresa la PrP ovina (alelo VRQ/VRQ, cepa Tg338, Vilotte et al. (2001) *J. Virol.* 75: 5977-5984). Esta cepa (TAC) induce una mortalidad al cabo de 60 días en el ratón Tg338;

- el segundo modelo consiste en la inoculación de la cepa de ESB bovina en el ratón transgénico que sobreexpresa la PrP bovina (Castilla et al. (2003) *Arch. Virol.* 148: 677-691).

Preparación de las fuentes infecciosas y matrices

Las fuentes infecciosas corresponden bien:

1- a macerados de cerebro, llamados "macerado 100%", obtenidos por trituración de cerebro entero sin dilución en un tampón;

2- a homogeneizados de cerebro 20% (peso/volumen) en una disolución de glucosa al 5%, llamados "homogeneizado 20% glucosa", obtenidos por trituración mecánica de un fragmento de cerebro (x miligramos) en 4x microlitros de una disolución glucosada al 5%;

3- a homogeneizados de cerebro 20% (peso/volumen) en agua, llamados "homogeneizado 20% agua", obtenidos por trituración mecánica de un fragmento de cerebro (x miligramos) en 4x microlitros de agua.

Las matrices utilizadas para imitar los subproductos animales (SPA) corresponden bien a carne bovina picada del comercio (15% de materia grasa), o bien a SPA de hámster o de ratón, obtenidos por picado de una carcasa descuartizada entera.

- 5 La contaminación artificial de los SPA con una cantidad conocida de material infeccioso se ha realizado bien de forma homogénea por trituración, o bien de forma heterogénea por adición de un fragmento de cerebro en el seno de una bolita de matriz.

Preparación de las disoluciones para la realización de la primera etapa del procedimiento de la invención y medidas del pH

- 10 Las disoluciones de base débil se han preparado a 20°C por medio de Na₂CO₃ (carbonato de sodio), NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) y eventualmente de sosa (NaOH); los pH indicados corresponden bien al pH de la disolución (pH disolución), bien al pH medido inmediatamente después de mezcla de dicha disolución con la muestra que se va a tratar (pH inicial), o bien al pH medido al término del tratamiento en su totalidad (pH final).

- 15 Los pH se miden en el pHímetro (Knick 766). En la medida en que los volúmenes de tampón añadido pueden variar, la concentración de los tampones se expresa sistemáticamente en concentración final después de mezcla con la matriz que se va a tratar es decir (número de moles de Na₂CO₃ + número de moles de NaHCO₃)/volumen de mezcla.

Modelización-miniaturización de los procesos

Las mezclas de los diferentes productos que se van a tratar con las diferentes disoluciones químicas se han realizado de la forma más homogénea posible, bien por mezcla con pipeta, o bien por trituración.

- 20 Los tratamientos térmicos se realizan bajo control permanente de la temperatura por medio de un termopar (Hanna Instruments) que toma la temperatura en el interior del producto y en el tampón de cocción.

Análisis in vitro de la PrPres

- 25 Las muestras se han purificado en forma de homogeneizado 20% (peso/volumen). Para ello, los macerados se han triturado en 4 volúmenes de disolución glucosada al 5%. La PrPres contenida en estas muestras se ha purificado por medio de los reactivos del ensayo CEA-BioRad (Barret et al. (2003) *J. Virol.* 77: 8462-8469), luego se ha detectado por transferencia de Western, según el protocolo descrito anteriormente (Lasmezas et al. (1996) *J. Gen. Virol.* 77: 1601-1609). Después de purificación, las muestras se han vuelto a suspender por medio de un tampón Laemmli (Laemmli, (1970) *Nature* 227: 680-685), y el equivalente de 5 mg de cerebro se ha depositado sobre un gel de poliacrilamida y transferido sobre una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell).

- 30 El revelado se ha realizado por medio de un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la PrP murina (SAF-60, Féraudet et al. (2005) *J. Biol. Chem.* 280: 11247-11258). Se ha utilizado un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a la peroxidasa como anticuerpo secundario (Southern Biotechnology Associates), y la inmunorreactividad se ha detectado por quimiluminiscencia por medio del kit ECL Amersham y se ha detectado por autorradiografía.

Inoculación en el animal de laboratorio

- 35 Los animales anestesiados han sido inoculados por vía intra-cerebral con 50 µl (hámster) o 20 µl (ratón) de los productos que se van a ensayar. Para cada tratamiento y cada grupo control, se han inoculado de 4 a 8 animales.

El título infeccioso se ha establecido sobre la base de los datos de muerte y de la constancia de la fase terminal. El examen clínico esté unido a la observación de los signos patognomónicos de las encefalopatías subagudas espongiiformes transmisibles.

- 40 Antes de la aparición de los primeros signos clínicos en los grupos testigo (hasta 50^o día por los hámsteres y los ratones transgénicos con sobreexpresión de la PrP ovina, 150^o día para los ratones que sobreexpresa la PrP bovina), los animales de todos los grupos se han observado clínicamente una vez por semana. A partir de estos datos y hasta el final del estudio, los exámenes clínicos se han practicado tres veces por semana.

Los signos clínicos son de cinco tipos:

- 45
- trastornos del comportamiento (excitabilidad, trastornos de la nidación y de la higiene),
 - pérdida del reflejo del posicionamiento visual,
 - ataxia cerebelosa, marcha anormal, postración,
 - obesidad y luego adelgazamiento,
 - paraplejía y luego tetraplejía.

- 50 Las observaciones se han registrado después de cada examen clínico, y se han registrado los signos clínicos y las muertes. Con los animales en fase terminal de la enfermedad se ha practicado la eutanasia para limitar su sufrimiento.

En caso de muerte de los animales inoculados con los productos tratados, la media de tiempo de supervivencia de estos grupos se ha comparado con la media de los tiempos de supervivencia de los animales en los grupos de control (animales inoculados con diluciones crecientes del material infeccioso inicial calentado a 100°C durante 3 minutos). Es posible entonces estimar la carga infecciosa residual después del tratamiento, y determinar así el nivel de reducción aportado por este tratamiento.

Dieciocho meses después de la inoculación (fin del estudio) de los diferentes productos, a todos los animales supervivientes se les ha practicado la eutanasia. Los cerebros de estos animales se han extraído, y la cantidad de PrPres eventualmente presente en estos cerebros se ha estimado por medio de una técnica bioquímica (ELISA o transferencia de Western). Los cerebros de algunos animales muertos en el curso de la experimentación también se han estudiado por medio de este ensayo bioquímico.

Ejemplo 1

Se ha mezclado un fragmento de cerebro de hámster infectado con la cepa 263K (50 mg) con 5 microlitros de agua, de sosa o de una disolución de carbonato/bicarbonato. Las diferentes mezclas se han incubado entonces 5 minutos a 60°C, y luego 3 minutos a 115°C a 10 bares de presión.

Se observa en la Figura 1 que la cantidad de PrPres detectada al término del calentamiento en agua no se modifica más que un poco (línea 1), mientras que la adición de una disolución de sosa 5M inicial (línea 3), que permite incrementar el pH del cerebro a 13, elimina cualquier traza de PrPres. En cambio, la adición de sosa 0,5M de concentración inicial (línea 4), que ajusta el pH del cerebro a 11, no reduce más que muy poco la cantidad de PrPres. De forma sorprendente, la adición de la disolución de carbonato/bicarbonato (1M de concentración inicial) (línea 2) a pH = 11 según el procedimiento de la invención, permite también eliminar cualquier traza de PrPres.

Ejemplo 2

Diferentes sustancias químicas en disolución (hidróxido de sodio NaOH, bicarbonato de sodio NaHCO₃, carbonato de sodio Na₂CO₃), solos o en asociación, y en diferentes concentraciones, se han añadido en la proporción de 33% (peso/volumen) a diferentes matrices (cerebro de ternera, carne picada o cerebro de hámster infectado por la cepa 263K). En la práctica, se ha añadido 1 ml de disolución a 2 gramos de matriz.

Después de mezcla homogénea, esta última se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente, se calienta 2 minutos a 100°C y luego 10 minutos a 115°C.

Se han medido los pH de las diferentes disoluciones. En el caso de la matriz correspondiente al cerebro de ternera, el pH se ha medido inmediatamente después de la mezcla, antes de calentamiento (al cabo de los 20 minutos de incubación a temperatura ambiente), y después de calentamiento. Después de la mezcla de estas disoluciones con la carne picada, se ha medido el pH después de calentamiento, y la cantidad de agua eliminada durante el tratamiento se ha estimado mediante medida de la pérdida de peso de la bolita de carne. Después de mezcla de estas disoluciones con cerebro de hámster infectado por la cepa 263K, se ha estimado la cantidad de PrPres residual.

Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Efecto de diferentes disoluciones alcalinas sobre el pH, la hidratación y la reducción de la PrPres. Las concentraciones mencionadas corresponden a la concentración del producto después de mezcla con la matriz.

Producto	pH de la disolución	Cerebro ternera			Carne picada		263K
		pH inicial	pH antes de calentamiento	pH final	pH final	Evolución del peso	Reducción de la PrPres
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 150mM pH11	11,00	9,98	9,87	9,96	9,65	+7%	>3,5 logs
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 150mM pH 10	9,83	9,56	9,48	9,76	9,30	-3%	>3,5 logs
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 150mM pH 9,5	9,34	8,99	8,94	9,75	9,61	-10%	>3,5 logs
NaOH 50 mM + Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 100mM pH 10	12,20	9,81	N.D.	9,77	9,58	+7%	>3,5 logs
H ₂ O		6,65	6,68	6,75	6,44	-42%	0,5 log

5 Se observa en primer lugar que el procedimiento de la invención permite reducir la cantidad de PrPres en el cerebro de hámster infectado con la cepa 263K a un nivel indetectable (Reducción >3,5 logs). A este respecto, se observa que de forma sorprendente, la ausencia de PrPres detectable no depende del pH inicial del tampón utilizado, ni del pH de la matriz después de adición de dicho tampón (pH inicial) sino del pH obtenido después de calentamiento (pH final), que está comprendido entre 9 y 10 en este ejemplo. Por otra parte, se observa que el procedimiento de la invención permite mantener un nivel de hidratación conveniente de la carne picada, que se manifiesta por una débil pérdida de masa después de tratamiento, contrariamente al testigo (agua).

Los tratamientos presentados en la Tabla 1 conducen a los siguientes efectos observados sobre la carga infecciosa de un homogeneizado de cerebro (Tabla 2):

10 Tabla 2: Efecto de diferentes disoluciones alcalinas sobre la infecciosidad de los priones. Las concentraciones mencionadas corresponden a la concentración del producto después de mezcla con la matriz.

Producto	pH de la disolución	Reducción de la PrPres	Animales	% mortalidad	Periodo de incubación	Reducción del título infeccioso
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 150 mM pH11	11,00	>3,5 logs	3 / 7	43%	490 ± 39	>5
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 150 mM pH10	9,83	>3,5 logs				
Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 150 mM pH9,5	9,34	>3,5 logs	5 / 6	83%	352 ± 89	>5
NaOH 50 mM + Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 100 mM pH10	12,20	>3,5 logs				
H ₂ O		0,5 log	8 / 8	100%	105 ± 6	1,5

Ejemplo 3

15 En este ejemplo, la disolución de carbonato/bicarbonato, a un pH inicial de 11, se ha añadido a un macerado de cerebro en concentraciones variables, en la proporción de 33% (peso/volumen). En la práctica, 25 microlitros de disolución han sido añadidos a 50 mg de cerebro.

Después de mezcla homogénea e incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos, se ha calentado la mezcla a 100°C durante 2 minutos, y luego a 115°C durante 10 minutos. Los resultados se presentan en la Figura 2.

20 Se observa que para todas las condiciones con una concentración de disolución carbonato/bicarbonato superior o igual a 50mM, la desaparición de PrPres es completa.

En este dispositivo experimental, para las concentraciones de 10mM y 25mM, que no permiten alcanzar un pH después de calentamiento de 8,5, la destrucción es incompleta.

Ejemplo 4

25 En este ejemplo, matrices que imitan los subproductos animales (SPA) (SPA de hámster o de ratón, obtenidos por picado de una carcasa descuartizada entera) se han contaminado de forma artificial con una cantidad conocida de material infeccioso (50 mg de cerebro con un título de 10¹⁰ DL50/g por 150 mg de SPA, es decir una matriz que contiene 25% (masa/masa) de material infeccioso) de forma homogénea por trituración. Estas muestras infecciosas se han mezclado bien con agua, o bien con un tampón de carbonato/bicarbonato a pH = 11 a 100mM durante 20 minutos a temperatura ambiente (primera etapa), y luego se han calentado durante 3 minutos a 115°C en autoclave (segunda etapa).

30 Después de administrar al animal, se observa entonces una reducción de la infecciosidad, caracterizada por una duración de incubación larga de 240 ± 88 días antes de la aparición de los signos clínicos (frente a 107 ± 4 días con una incubación en agua), lo que corresponde a una reducción de la infecciosidad de 5 a 6 log, es decir un factor de 10⁻⁵-10⁻⁶.

35 Un experimento similar realizado con el prion de la encefalopatía espongiforme bovina como agente infeccioso da una duración de incubación larga superior a 567 días (frente a 345 ± 24 días con una incubación en agua), lo que corresponde a una reducción de la infecciosidad de 4 log, es decir un factor 10⁻⁴.

Ejemplo 5

1. Ensayo 1: Desgrasado previo a la primera etapa

Este ensayo consiste en añadir a 20 gramos de subproductos animales (materia cruda multi-especie C3, desechos de carnicería) 2 ml (es decir 10% volumen/peso) de agua o de Na₂CO₃/NaHCO₃ pH 11 (C11) a 1,5M (150mM final).
 5 Después de calentamiento en el interior durante 40 minutos a 80°C, el prensado ha permitido obtener 6 ml de líquido de los que 1,5 ml son grasa.

El efecto de este protocolo sobre la PrPres se ha estudiado sobre el cerebro de hámster 263K solo o mezclado con carne de ternera (1 volumen de cerebro por 3 volúmenes de carne). En la práctica, 50 mg de cerebro + 150 mg de carne se han mezclado con 20 µl de agua, y luego se han calentado a 80°C durante 40 minutos. Se han añadido
 10 cuarenta microlitros de sustancia alcalina (o de agua), y luego se calienta todo a 115°C durante 5 minutos.

Este ensayo muestra que el desgrasado previo del producto animal no modifica la acción de la sustancia alcalina, realizada en las condiciones de la invención, en la descontaminación del prion.

Los resultados se ilustran en la figura 3, pistas 1 (agua) y 2 (C11).

2. Ensayo 2: Desgrasado simultáneo a la primera etapa

15 El protocolo propuesto en este contexto es el siguiente:

- mezcla de la matriz que se va a descontaminar con una fracción de la sustancia alcalina;
- incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir una buena penetración del producto en el interior;
- calentamiento durante 40 minutos a 80°C en el interior;
- 20 - prensado y eliminación del líquido y de las grasas evacuadas;
- adición de la fracción restante de la sustancia alcalina (base débil) idéntica a la del ensayo 1;
- calentamiento 5 minutos a 115°C.

En la práctica, 50 mg de cerebro + 150 mg de carne se han mezclado con 20 microlitros de sustancia alcalina. Después de espera y calentamiento a 80°C durante 40 minutos, se han añadido 40 microlitros de sustancia alcalina
 25 complementaria, y luego todo se calienta a 115°C durante 5 minutos.

Los resultados se ilustran en la figura 3, pistas 3 y 4.

Este ensayo muestra que el desgrasado simultáneo del producto animal no modifica la acción de la sustancia alcalina, realizada en las condiciones de la invención, (incluido cuando la adición de la base débil se realiza en dos veces), en la descontaminación del prion.

30 Tabla 3. Resumen las condiciones de los ensayos 1 y 2

Pistas figura 3	Primer tratamiento (en el transcurso del desgrasado)	Segundo tratamiento (después del desgrasado, en adelante llamado primera etapa del procedimiento de descontaminación)
1	Agua	Agua
2	Agua	C11 150mM
3	C11 150mM	C11 150mM
4	C11 30mM	C11 170mM

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de tratamiento descontaminante de productos animales que comprende las siguientes etapas:
 - una extracción de las grasas de dichos productos animales, previamente a la primera etapa;
 - una primera etapa de puesta en contacto de dichos productos animales desgrasados con al menos una base débil que tenga un pKa comprendido entre 9 y 12 para formar una mezcla;
 - una segunda etapa que comprende al menos un calentamiento principal de la mezcla a una temperatura en el interior de al menos 100°C e inferior a 121°C durante un tiempo de 5 a 15 minutos, siendo dicho calentamiento principal un calentamiento húmedo; en el que el pH de la mezcla a la salida de la segunda etapa es superior o igual a 9 e inferior a 11.
2. Procedimiento de tratamiento descontaminante de productos animales que comprende las siguientes etapas:
 - una extracción de las grasas de dichos productos animales, simultáneamente a la primera etapa de puesta en contacto de dichos productos animales con al menos una base débil que tenga un pKa comprendido entre 9 y 12 para formar una mezcla;
 - una segunda etapa que comprende al menos un calentamiento principal de la mezcla a una temperatura en el interior de al menos 100°C e inferior a 121°C durante un tiempo de 5 a 15 minutos, siendo dicho calentamiento principal un calentamiento húmedo; en el que el pH de la mezcla a la salida de la segunda etapa es superior o igual a 9 e inferior a 11.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que la base débil es una sal de carbonato.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad de base débil y de formas ácidas o básicas conjugadas de la base débil eventualmente puestas en contacto con el producto animal conjuntamente con la base débil, referida al volumen de la mezcla, es inferior a 1 mol·L⁻¹.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la cantidad de base débil y de formas ácidas o básicas conjugadas de la base débil eventualmente puestas en contacto con el producto animal conjuntamente con la base débil, referida al volumen de la mezcla, es al menos 100 mmol·L⁻¹.
6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la base débil se aporta en forma de polvo o en forma de disolución.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que la disolución de base débil presenta un pH de al menos 10,5.
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la mezcla se incuba durante al menos 10 minutos antes de la realización de la segunda etapa.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que la temperatura de incubación de la mezcla antes de la realización de la segunda etapa es inferior a 50°C.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el calentamiento principal está seguido por un calentamiento adicional a una temperatura superior o igual a 121°C.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el producto animal se tritura previamente a la primera etapa de forma que se obtenga una granulometría media inferior a 100 mm.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el producto animal es un subproducto animal.
13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el tratamiento descontaminante es un tratamiento descontaminante del prion.
14. Procedimiento de obtención de proteínas animales transformadas (PAT), que comprende la realización de un procedimiento de tratamiento descontaminante de productos animales según una de las reivindicaciones 1 a 13.
15. Procedimiento de obtención de proteínas animales transformadas según la reivindicación 14, en el que dichos productos animales son productos animales de categoría 1 en el sentido del Reglamento (CE) nº 1774/2002, en particular productos animales con riesgo de prion.

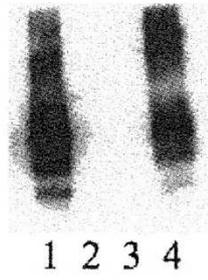


Figura 1

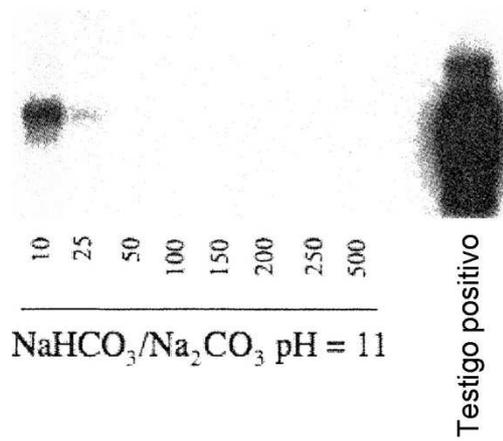


Figura 2

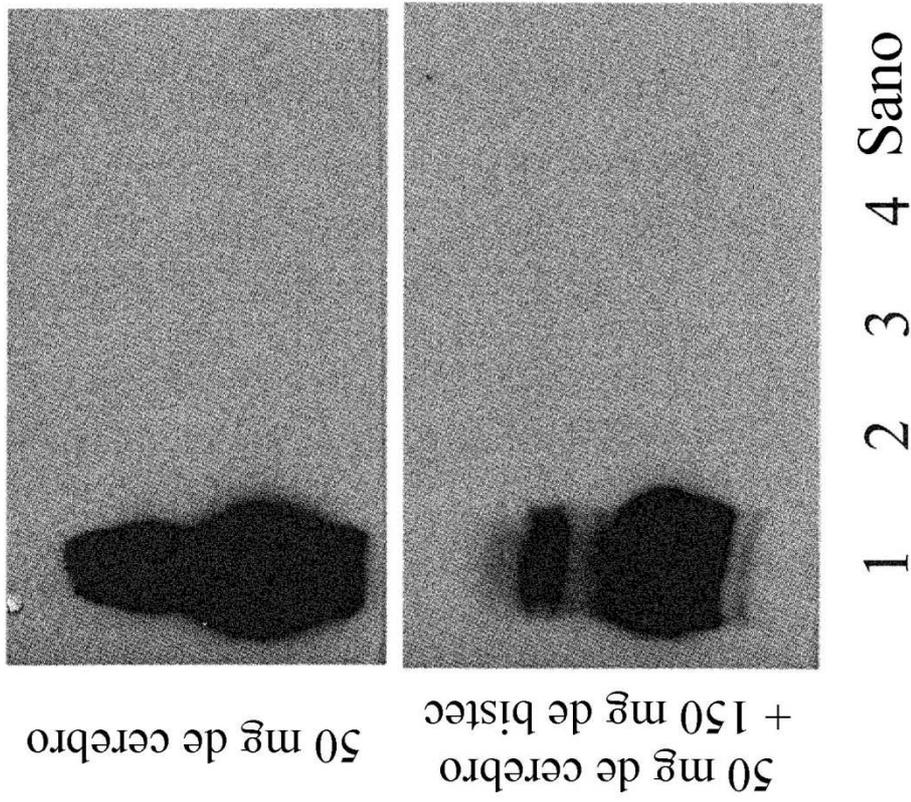


Figura 3