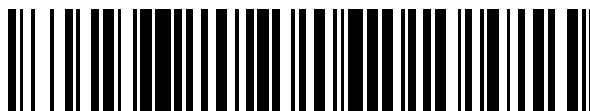


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 189**

51 Int. Cl.:

A23L 15/00	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
A23B 5/015	(2006.01)
A23L 3/015	(2006.01)
A23B 5/00	(2006.01)
A23L 3/32	(2006.01)
A61K 35/57	(2015.01)
A23L 33/17	(2006.01)
A23B 5/03	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2013 E 13197015 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2883461**

54 Título: **Proceso para producir folistatina activa**

30 Prioridad:

11.12.2013 EP 13196770

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

08.03.2018

73 Titular/es:

**DEUTSCHES INSTITUT FÜR
LEBENSMITTELTECHNIK E.V. (50.0%)
Prof.-von-Klitzing-Strasse 7
49610 Quakenbrück, DE y
OVOBEST EIPRODUKTE GMBH & CO. KG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HEINZ, VOLKER y
FRANKE, KNUT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 658 189 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso para producir folistatina activa

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir una composición que comprende folistatina biológicamente activa a partir de una fuente biológica, especialmente a partir de huevos de ave fertilizados, preferiblemente clara de huevo, cuya composición está conservada y especialmente libre de patógenos, y es estable al almacenamiento, preferiblemente a temperatura ambiente. Además, la invención se refiere a la composición que contiene folistatina biológicamente activa cuya composición está disponible mediante el proceso de producción. Se ha encontrado que la folistatina es una glicoproteína secretada que tiene actividad para inhibir miembros de la familia de TGF- β , preferiblemente para inhibir miostatina. Tras la ingestión, la composición tiene actividad para apoyar, inducir y/o regular positivamente el aumento de músculo en seres humanos y animales. La composición es por lo tanto adecuada para uso como ingrediente alimentario o aditivo nutricional para seres humanos y animales, p.ej. para uso como compuesto para mejorar el aumento muscular y/o la regeneración muscular.

10 Preferiblemente, el proceso para producir la composición, y la composición misma, están libres de conservantes químicos añadidos, lo más preferiblemente el proceso para producir la composición y la composición, respectivamente, consisten esencialmente en los componentes naturales del material de partida, p.ej. huevo y sus componentes, preferiblemente yema de huevo, incluyendo opcionalmente clara de huevo, sometidos solo a las etapas de tratamiento físico del proceso. Como alternativa a la yema de huevo, pueden someterse clara de huevo, que también se denomina clara o albúmina de huevo y huevo entero a las etapas del proceso.

Estado de la técnica

20 El documento US 2007/0275036 A1 describe que la folistatina es conocida por estar presente en huevos de ave fertilizados y que es biológicamente activa para aumentar la masa muscular y facilitar la regeneración muscular en seres humanos. Aunque se muestra que la pasteurización de la yema de huevo líquida inactiva la actividad biológica de la folistatina contenida en la misma, se describe que la yema de huevo emulsionada liofilizada puede irradiarse, p.ej. por radiación gamma o por un rayo de electrones, para conservación sin inactivar la folistatina.

25 El documento WO89/01945 describe el aislamiento de folistatina a partir de fluido folicular porcino mediante cromatografía de afinidad con Sepharose-heparina, filtración en gel y varias HPLC en fase inversa sucesivas con diferentes fases estacionarias y móviles. Usando NaCl 0,01 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7 para lavar y NaCl 1 M, Tris-HCl 0,01 M, pH 7 para elución, se describe que la cromatografía de afinidad con Sepharose-heparina recupera un 90% de la actividad del fluido folicular porcino bruto.

30 Los documentos EP 2674033 y PCT/EP2013/062068, que son relevantes según el Art. 54(3) de la CPE solo, describen la producción de una composición conservada que contiene folistatina sometiendo huevo entero, clara de huevo, yema de huevos de ave fertilizados o suero sanguíneo animal bruto a una presión de al menos 4500 bar durante al menos 1 min o a un campo eléctrico por pulsos de al menos 5 kV/cm a un caudal de 30 l/h. Opcionalmente, previamente a la conservación, pueden concentrarse las membranas de huevo insolubles, concretamente pueden concentrarse la membrana de yema de huevo y/o chalazas.

35 El documento US 2007/0275036 A1 describe la liofilización de huevos de gallina para producir un polvo que contiene folistatina activa, mientras que la irradiación gamma no daba como resultado folistatina medible. El documento WO 89/01945 A1 describe un método de purificación para folistatina a partir de fluido folicular porcino. El documento EP 1714659 A1 describe la electroestimulación de un animal no humano y la irradiación gamma de suero sanguíneo obtenido del animal.

El documento US 2005/0287260 A1 describe la conservación de productos del huevo por pasteurización de material del huevo p.ej. a 60-65°C, radiación electromagnética u ondas de radio de alta frecuencia, seguido de tratamiento a presión y opcionalmente adición de un agente antimicrobiano.

45 El documento US 2008/0311259 A1 describe un tratamiento a alta presión, especialmente de productos líquidos del huevo, para inactivar microorganismos.

D'Antona *et al.*, Journal of Endocrinology 157-162 (2000) describe que se analizaron folistatina y activina A en muestras de suero sanguíneo.

Yan *et al.*, Eur. Foods Res. Technol. 371-377 (2010) se refiere a la influencia del tratamiento a alta presión sobre la actividad emulsionante de yema de huevo.

50 El resumen inglés del documento CN100998422 describe que puede usarse tratamiento con campo eléctrico por pulsos en la conservación de productos líquidos del huevo en combinación con lisozima añadida.

Amiali *et al.*, Journal of Food Engineering 689-694 (2007) describe que el tratamiento con campo eléctrico por pulsos de yema de huevo líquida puede reducir la población de *E. coli* y *Salmonella enteritidis*. Góngora-Nieto *et al.*, Journal of Food Engineering 209-216 (2003) describe que el huevo entero líquido que se acidificaba con ácido cítrico no se

conservaba térmicamente por tratamiento con campo eléctrico por pulsos. Martín-Belloso *et al.*, Journal of Food Processing and Preservation 193-208 (1997) se refiere a la inactivación de *E. coli* en el huevo con un campo eléctrico por pulsos.

- 5 Huang *et al.*, Biosystems Engineering 403-413 (2006) describe la inactivación de *Salmonella enteritidis* en huevo líquido entero usando un campo eléctrico por pulsos, alta presión y/o tratamiento con ultrasonidos.

Objetos de la invención

Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso alternativo para producir una composición que contiene folistatina activa a partir de huevos de ave fertilizados o suero sanguíneo animal, dando dicho proceso como resultado una mayor concentración de folistatina.

10 Descripción general de la invención

La invención consigue el objeto mediante los rasgos de las reivindicaciones, y especialmente se refiere a un proceso para producir una composición que contiene folistatina biológicamente activa a partir de un material de partida que se selecciona de huevos de ave fertilizados o sus componentes, especialmente a partir de yema de huevo, clara de huevo o huevo entero, siendo la clara de huevo el material de partida preferido, de huevos de ave fertilizados y/o
 15 suero sanguíneo animal, comprendiendo el proceso la concentración de folistatina y la conservación mientras se mantiene una temperatura menor de 38°C, preferiblemente menor de 20°C, más preferiblemente menor de 10°C. Por consiguiente, la etapa de concentración de una fracción de proteína soluble a partir del material de partida separa una fracción de proteína soluble que contiene folistatina, p.ej. a una mayor concentración con relación al peso total, preferiblemente en relación con la proteína total del material de partida. La etapa de concentración de folistatina
 20 concentra folistatina a partir de la proteína soluble o soluto del material de partida y comprende o consiste en separar una fracción de proteína soluble que contiene folistatina del material de partida, p.ej., clara de huevo. La fracción de proteína soluble que contiene folistatina puede separarse p.ej. por precipitación seguida de sedimentación, que preferiblemente es centrifugación. La precipitación puede causarse por acidificación, p.ej. para clara de huevo a pH 6 o menor, p.ej. a pH 5,0, más preferiblemente a aprox. pH 5,5 y/o mediante la adición de sal hidrosoluble en forma de sólido o de una solución acuosa y/o adición de un disolvente, p.ej. metanol, etanol y
 25 mezclas de los mismos, al material de partida.

Se ha encontrado que la clara de huevo de huevos de gallina fertilizados (*Gallus domesticus*) tiene una concentración de folistatina de aprox. 15 a 30 µg/kg, mientras que la yema de huevo contenía solo de 1 a 3 µg/kg y aprox. un 30% en peso (% p) de grasas. También en vista de su contenido de grasa muy bajo a despreciable, la clara de huevo es el material de partida preferido.
 30

Se encontró que la sedimentación de clara de huevo con folistatina precipitada durante 24 h por gravedad natural daba como resultado una concentración de aprox. 75 a 80 µg/kg de sedimento, un aumento frente a la clara de huevo en este caso por un factor de 3 a 4. La centrifugación puede realizarse, p.ej. al menos a 800 x g, preferiblemente al menos a 1000 x g durante al menos 3 min, preferiblemente al menos 5 min.

35 La precipitación puede ser por acidificación del material de partida, p.ej. por adición de ácido, p.ej. un ácido de pureza alimentaria, especialmente ácido fosfórico, ácido hidrocórico, ácido acético, ácido málico, ácido cítrico y/o preferiblemente ácido láctico y/o por fermentación del material de partida mientras se reduce la concentración de azúcar, especialmente del azúcar reductor contenido en el material de partida, p.ej. en la clara de huevo, mediante la adición de bacterias productoras de ácido, preferiblemente bacterias productoras de ácido láctico, p.ej. lactobacilos,
 40 p.ej. cultivos de inicio comercialmente disponibles para yogur (disponibles en Chr. Hansen A/S, Dinamarca). La fermentación de clara de huevo puede ser en condiciones conocidas para la retirada de azúcares reductores, p.ej. con bacterias productoras de ácido láctico a 4°C durante 18 h. La adición de ácido puede ser en forma de ácido líquido, p.ej. en forma de solución acuosa, o de sólido.

La precipitación puede realizarse mediante la adición de sal, en la que la sal puede ser una sal neutra, p.ej. acetato de amonio y/o NaCl, y/o una sal ácida, p.ej. NaHCO₃, y/o una sal caotrópica, p.ej. KCl y/o sulfato de amonio. La concentración de la sal o mezcla de sales usada puede determinarse mediante la proporción de folistatina que está contenida en el precipitado separado, p.ej. determinada por PAGE-SDS. Por ejemplo, para KCl, puede usarse una concentración de 0,2 M a 0,3 M en clara de huevo, ya que se encontró que KCl 0,25 M daba como resultado la precipitación de una fracción de proteína que contenía folistatina que podía separarse por centrifugación a 1000 x g
 50 durante 5 min. Cuando el material de partida de clara de huevo contiene, p.ej., folistatina 16 µg/kg, se encontró que la fracción separada contiene, p.ej., folistatina 32,4 µg/kg.

Generalmente, y especialmente para bajas concentraciones de folistatina, se determinó preferiblemente la concentración de folistatina mediante ELISA que empleaba anticuerpos antifolistatina, p.ej. el kit de ELISA Human Follistatin Quantikine disponible en R&D Systems, Minneápolis, EE.UU., cuyo ensayo usa anticuerpo creado contra folistatina humana expresada recombinantemente.
 55

Opcionalmente, la folistatina precipitada puede solubilizarse a partir del precipitado separado previamente a o después de la conservación, p.ej. mediante un aumento del pH, p.ej. a al menos 7, preferiblemente a al menos 8,

más preferiblemente a un pH de 8,5 a 9,5, y/o disminución de la concentración salina, p.ej. por diálisis o dilución con agua.

5 La etapa de conservación comprende o consiste en someter preferiblemente la fracción de proteína soluble que contiene folistatina a una presión de al menos 4000 bar durante al menos 1 minuto, preferiblemente a 5500-6500 bar, más preferiblemente a 6000 bar durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante 3 minutos, más preferiblemente durante al menos 5 minutos, preferiblemente usando compresión adiabática y liberación de presión, y/o tratamiento con campo eléctrico por pulsos, preferiblemente en un proceso continuo mientras se bombea el huevo líquido o sus componentes, especialmente yema de huevo, clara de huevo o huevo entero, a través del espacio limitado por al menos 2 electrodos de descarga generando, p.ej., una intensidad de campo eléctrico de 5 a 40 kV/cm, p.ej. de 5 a 12 kV/cm a un caudal de material de partida líquido o una fracción separada que contiene folistatina de 30 l/h a una temperatura de 30°C, preferiblemente usando pulsos unipolares que tienen una duración de pulso de 5 a 20 µs, preferiblemente de 10 µs, a una tasa de repetición de 70 a 200 Hz, especialmente pulsos rectangulares positivos. A una entrada de energía de 50 a 140 kJ/kg, la disminución de la contaminación bacteriana, determinada como UFC, era por un factor de 10 a 630, respectivamente. Preferiblemente, los huevos de ave fertilizados se obtienen de gallinas, concretamente *Gallus domesticus*.

20 Las realizaciones de la etapa de conservación son etapas de proceso no térmicas, concretamente el aumento de la temperatura que puede aparecer durante el tratamiento a alta presión y/o tratamiento con campo eléctrico por pulsos no es el causante de la reducción de microorganismos, especialmente de bacterias, para conseguir la conservación. Además, las realizaciones de la etapa de conservación son métodos de tratamiento físico, concretamente sin adición de compuestos químicos antimicrobianos. Por consiguiente, las realizaciones de la etapa de conservación son etapas de proceso no térmico consistentes en etapas de tratamiento físico que no generan radicales, y por lo tanto mantienen la estructura química de los ingredientes, especialmente de los ácidos grasos insaturados y vitaminas de la composición. Por consiguiente, la composición obtenible mediante el proceso contiene preferiblemente ácidos grasos insaturados en la constitución o conformación natural como en el material de partida.

25 El proceso tiene la ventaja de la etapa de concentración de la fracción rica en folistatina mediante precipitación y separación para reducir el volumen previamente a la liofilización, lo que reduce la energía requerida en esta etapa.

Es una ventaja adicional de las realizaciones del proceso, en las que la fracción de proteína que contiene folistatina se separa previamente a la etapa de conservación por tratamiento a alta presión, que se los volúmenes menores necesitan tratamiento a alta presión.

30 El tratamiento a alta presión y/o el tratamiento con campo eléctrico por pulsos de un material de partida que es huevo líquido entero, yema de huevo líquida, preferiblemente clara de huevo líquida y/o suero sanguíneo animal, reduce eficazmente la contaminación bacteriana por un factor de al menos 10, preferiblemente por un factor de al menos 100, más preferiblemente de al menos 1000. Por ejemplo, para el tratamiento a alta presión, se encontró una reducción de la contaminación bacteriana a aproximadamente 50 UFC/g, correspondiente a una reducción por un factor de 3000, al partir de yema de huevo líquida bruta que tiene un contenido bacteriano natural de $1,5 \times 10^5$ UFC/g. Para el tratamiento con campo eléctrico por pulsos, se encontró una reducción por un factor de 10 a un factor de 1000. La reducción de la contaminación microbiológica natural por el tratamiento a alta presión y/o el tratamiento con campo eléctrico por pulsos es suficiente para conservar la clara de huevo, huevo entero o yema de huevo.

40 Preferiblemente, el proceso posterior a la etapa de conservación comprende secado, especialmente liofilización de la fracción de proteína soluble que contiene folistatina del huevo líquido, especialmente yema de huevo, clara de huevo o huevo entero, o de la fracción de proteína soluble que contiene folistatina de suero sanguíneo animal, respectivamente, dando como resultado un polvo que contiene la fracción de huevo, especialmente polvo que contiene yema de huevo, clara de huevo o huevo entero o polvo de suero de fracción de sangre animal, p.ej. un polvo consistente esencialmente en la fracción que contiene folistatina que se trata a alta presión y/o se trata con campo eléctrico por pulsos. Como alternativa a la liofilización, el secado puede ser secado en lecho fluidizado, preferiblemente a una temperatura de o por debajo de 42°C, preferiblemente de o por debajo de 40°C, más preferiblemente de o por debajo de 38°C o de o por debajo de 35°C. Debido al secado, el producto resultante puede comprender proteína no hidrosoluble incluso si la fracción acuosa contiene principalmente proteína soluble.

50 Se ha encontrado que el proceso para la producción de la composición que contiene folistatina que comprende una etapa de conservación que comprende o consiste en tratamiento a alta presión y/o tratamiento con campo eléctrico por pulsos, preferiblemente con secado posterior, especialmente pero sin limitación liofilización, conduce tanto a una reducción eficaz de la contaminación bacteriana como se determina, p.ej. como bacterias viables, como al mantenimiento de la actividad biológica de la folistatina, p.ej. al menos al 50%, preferiblemente al menos al 70%, más preferiblemente al menos al 80%, más preferiblemente al menos al 85%, al menos al 90% o al menos al 95%, con referencia a la actividad de folistatina en el material de partida.

Especialmente en vista de los procesos de conservación que usan irradiación, es una ventaja del proceso de la invención que no se generen radicales por la etapa de conservación, y por lo tanto la fracción que contiene folistatina conservada resultante de yema de huevo, clara de huevo o huevo entero líquidos, o suero sanguíneo animal, que

preferiblemente se seca posteriormente, preferiblemente se liofiliza, contiene menos o ningún radical y productos de reacción de radicales. P.ej., la yema de huevo, clara de huevo o huevo entero líquidos conservados, así como la yema de huevo o huevo entero conservados secados, preferiblemente liofilizados, contiene ácidos grasos insaturados de la yema de huevo, esencialmente en su estado y composición naturales, p.ej. sin cambios en sus 5 doble enlaces. Por consiguiente, la composición obtenible mediante el proceso de la invención contiene preferiblemente los ácidos grasos insaturados de yema de huevo sin cambios de sus dobles enlaces, concretamente, en su constitución biológica natural.

Preferiblemente, en el proceso no se añaden conservantes químicos, p.ej. no se añade un agente antimicrobiano. Opcionalmente, se añade un antioxidante, p.ej. ácido ascórbico o una sal neutra del mismo. Preferiblemente, el 10 huevo entero, yema de huevo, más preferiblemente clara de huevo o suero sanguíneo animal, respectivamente, está libre de ingrediente añadidos, p.ej. el huevo entero, yema de huevo, o más preferiblemente la clara de huevo, o el suero sanguíneo animal, respectivamente, se someten a etapas de proceso físico solo que comprenden, preferiblemente que consisten en separar una fracción de proteína soluble que contiene folistatina del material de 15 partida, que es p.ej. huevo entero líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida, o suero animal respectivamente, y someter esta fracción a tratamiento de alta presión y/o tratamiento con campo eléctrico por pulsos, preferiblemente seguido de secado, p.ej. liofilización o secado en lecho fluidizado. Como alternativa, el material de partida se somete en primer lugar al tratamiento con campo eléctrico por pulsos y entonces se separa la fracción que contiene folistatina del material de partida conservado.

Para el tratamiento a alta presión, se prefiere que el huevo entero líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida o 20 suero sanguíneo animal, o fracción que contiene folistatina de los mismos, respectivamente, esté contenido en envases sellados que tengan una pared elástica, p.ej. en bolsas de plástico, más preferiblemente libres de gas, más preferiblemente desgasificadas. Para huevo entero, clara de huevo o yema de huevo líquida o suero sanguíneo animal libre de gas, respectivamente, en un envase, pueden expulsarse las burbujas de gas antes de sellar el 25 envase. Para desgasificar, puede aplicarse una presión reducida previamente al tratamiento de alta presión preferiblemente también previamente al tratamiento con campo eléctrico por pulsos.

El tratamiento a alta presión se lleva a cabo generalmente usando agua como medio de compresión que se bombea a una cámara sellada que contiene el huevo entero líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida o suero sanguíneo animal, respectivamente, hasta que se alcanza la alta presión, se mantiene la alta presión y se libera entonces la presión, p.ej. abriendo el envase a alta presión.

30 Se encontró que después del tratamiento a alta presión en envases sellados, p.ej. en bolsas de polietileno selladas, el material de partida seleccionado de preparación de huevo entero líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida o suero, o la fracción que contiene folistatina que se separa del material de partida, respectivamente, es estable, p.ej. durante 12 a 24 horas, preferiblemente durante 2 a 5 días, p.ej. a 5 a 10°C, sin un aumento drástico de la contaminación bacteriana, y especialmente sin una pérdida significativa de actividad de folistatina.

35 Para el tratamiento a alta presión, el aumento adiabático de temperatura debido a la alta presión se contrarresta preferiblemente enfriando el huevo entero líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida o suero, o la fracción que contiene folistatina separada del material de partida, respectivamente, a una temperatura que está al menos 5°C, preferiblemente aproximadamente 10°C, por debajo de la temperatura máxima, p.ej. por debajo de 38°C 40 previamente al tratamiento. Preferiblemente, previamente al tratamiento de alta presión y/o del tratamiento con campo eléctrico por pulsos, el huevo entero líquido, clara de huevo o yema de huevo líquida o suero, o la fracción que contiene folistatina separada del material de partida, respectivamente, se enfría a una temperatura de entre 0 y 28°C, preferiblemente a 5 a 20°C, más preferiblemente a un máximo de 10°C.

Para el tratamiento con campo eléctrico por pulsos, se encontró que una corta elevación de temperatura, p.ej. hasta 45 un máximo de 45°C, preferiblemente hasta un máximo de 42°C o 40°C, durante como máximo 10 s, preferiblemente durante como máximo 5 o como máximo 2 s, da como resultado una lenta pérdida de folistatina activa. Por consiguiente, para el tratamiento con campo eléctrico por pulsos, la elevación corta de temperatura anteriormente mencionada es aceptable, aunque menos preferida.

Se determinó la folistatina activa por separación por tamaño, p.ej. por HPLC de exclusión por tamaño o por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS), opcionalmente seguido de transferencia Western y 50 detección inmunoespecífica usando un anticuerpo antifolistatina. Se usó una reducción de la señal específica de tamaño identificada para folistatina en yema reciente de huevos fertilizados como indicador de la reducción de la actividad de folistatina, porque una inactivación de la folistatina da como resultado el cambio, p.ej. la reducción, del tamaño de molécula.

Opcionalmente, el proceso comprende una etapa de concentración también de las membranas de huevo entero, 55 clara de huevo o yema de huevo de los huevos fertilizados previa o simultáneamente a la separación de la fracción que contiene folistatina. Para concentrar las membranas, se usa la fracción de huevo entero, clara de huevo o yema de huevo que tiene la mayor proporción de folistatina, obteniéndose la fracción, p.ej., por separación por tamaño o por separación por densidad. La fracción preferida es la fracción que contiene la membrana de yema de huevo, p.ej. obtenida separando yema de huevo o huevo entero, y la fracción que contiene chalazas, p.ej. obtenida separando la

clara de huevo o huevo entero. La fracción preferida contiene la porción principal de la membrana de yema de huevo y/o las chalazas de huevo entero, clara de huevo o yema de huevo sometida a la etapa de concentración, p.ej. etapa de precipitación y separación. Par separar y concentrar las membranas por separación por tamaño, puede usarse tamizado, p.ej. con un tamaño de malla de 0,5 mm a 2 mm, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a 1 mm.

5 Usando separación por tamaño, la fracción de membrana preferida es la membrana de yema de huevo y/o la fracción que contiene chalazas, que es la fracción particulada o grande. Para separar por separación por densidad, se usa la centrifugación, p.ej. usando un separador centrífugo. Usando la separación por densidad de huevo entero, clara de huevo o yema de huevo, la fracción de mayor densidad es la fracción preferida.

10 Opcionalmente, previamente a la etapa de concentración de las membranas de huevo entero, clara de huevo o yema de huevo de huevos fertilizados por separación de la fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o chalazas, el huevo entero, clara de huevo o yema de huevo puede diluirse para facilitar la etapa de separación, p.ej. usando agua como diluyente, y conteniendo opcionalmente el agua sal. Más opcionalmente, pueden añadirse una sal y/o ácido y/o alcohol para la precipitación de la fracción de proteína hidrosoluble que contiene folistatina, o puede realizarse una fermentación acidificante de la clara de huevo y pueden separarse chalazas y/o membrana de yema de huevo del material de partida simultáneamente a la separación de la fracción de proteína soluble precipitada que contiene folistatina.

20 Como alternativa o además de huevo entero, clara de huevo o yema de huevo de huevos fertilizados, el proceso puede practicarse usando suero sanguíneo de animales sacrificados como material de partida. Por consiguiente, el suero sanguíneo puede reemplazar a huevo entero, clara de huevo o yema de huevo en el proceso, y por lo tanto la descripción relativa a huevo entero, clara de huevo o yema de huevo hace también referencia al proceso con suero sanguíneo como material de partida. En esta realización, el proceso para producir una composición que contiene folistatina biológicamente activa comprende la etapa de proporcionar suero sanguíneo animal bruto, concentrar la fracción de proteína soluble que contiene folistatina y, previamente o preferiblemente posteriormente a la concentración de la fracción de proteína que contiene folistatina, someter el suero a una etapa de conservación mientras se mantiene la temperatura a o por debajo de 38°C, en el que la etapa de conservación se selecciona de someter el suero o la fracción a un tratamiento de alta presión de al menos 4500 bar durante al menos 1 min, de someter el suero o la fracción a un tratamiento con campo eléctrico por pulsos de al menos 5 kV/cm a un caudal de 30 l/h y de una combinación del tratamiento a alta presión y el tratamiento con campo eléctrico por pulsos para proporcionar una fracción de suero líquido conservada que contiene folistatina. La etapa de conservación puede consistir en tratamiento a alta presión, en el que con el suero o la fracción que contiene folistatina posteriormente a la separación del material de partida se rellenan envases, se sellan los envases y se someten a alta presión. La etapa de conservación puede consistir en tratamiento con campo eléctrico por pulsos del suero sanguíneo animal bruto o de la fracción que contiene folistatina posteriormente a la separación del material de partida por un campo eléctrico de 5 a 40 kV/cm. Posteriormente a la etapa de conservación, el suero o fracción conservado, respectivamente, puede opcionalmente secarse, p.ej. por liofilización o por secado en lecho fluidizado. Preferiblemente, entre la etapa de tratamiento de alta presión y la etapa de liofilización, se transporta el suero o fracción, respectivamente, a envases sellados en que el suero sanguíneo animal bruto se somete a tratamiento de alta presión.

40 Opcionalmente, el proceso puede comprender la etapa adicional de mezclar o encapsular la fracción que contiene folistatina conservada secada del material de partida. Preferiblemente, para mezclar o encapsular, la fracción que contiene folistatina secada y conservada del material de partida se mezcla con una solución, preferiblemente una solución acuosa de un agente encapsulante. El agente encapsulante puede ser, p.ej., un azúcar, alcohol de azúcar y/o polímero de azúcar, cuya solución en el proceso se mezcla con la fracción que contiene folistatina conservada y secada, y se seca produciendo yema de huevo, huevo entero o clara de huevo secado encapsulado. El azúcar puede ser, p.ej., sacarosa, fructosa, glucosa y/o jarabe de maíz. El alcohol de azúcar puede ser, p.ej., maltitol, isomaltitol, etc. El polímero de azúcar puede ser, p.ej., almidón, almidón modificado y/o celulosa y/o metilcelulosa, que preferiblemente sirve también como agente antiapelmazante.

50 Como ventaja específica del tratamiento de alta presión de yema de huevo líquida, huevo entero o clara de huevo o suero y de la fracción que contiene folistatina del material de partida, se ha encontrado que se potencia la biodisponibilidad y digeribilidad de la proteína, mientras que la folistatina mantiene esencialmente su actividad biológica. Por lo tanto, se prefiere el proceso que comprende la etapa de tratamiento de alta presión del material de partida, o de la fracción que contiene folistatina del mismo, para producir una composición conservada que contiene folistatina biológicamente activa, en cuya composición la proteína tiene una biodisponibilidad aumentada, p.ej. digeribilidad aumentada, por ejemplo con relación a la yema de huevo, huevo entero o clara de huevo líquido no tratado.

60 Para producir clara de huevo, huevo entero o yema de huevo, líquido o secado, que contiene una concentración deseada de folistatina activa, p.ej. la concentración natural de folistatina de clara de huevo, huevo entero o yema de huevo de huevos fertilizados, puede mezclarse la fracción que contiene folistatina conservada que se separa del material de partida, sin secado o posteriormente al secado, con clara de huevo, huevo entero o yema de huevo líquido o secado, obtenido de huevos no fertilizados. Esta etapa de mezclado de clara de huevo, huevo entero o yema de huevo, líquido o secado, obtenido de huevos no fertilizados permite que la fracción principal de la mezcla resultante, concretamente la clara de huevo, huevo entero o yema de huevo, líquido o secado, obtenido de huevos

no fertilizados pueda producirse usando procesos de conservación estándares, p.ej. conservación térmica y/o secado a temperaturas elevadas.

Descripción detallada de la invención

La invención se describe ahora mediante ejemplos no limitantes.

5 Ejemplo 1: Producción de una clara de huevo conservada que contiene folistatina activa

Se usaron huevos de gallina (*Gallus domesticus*) fertilizados contenidos de una estación de cría certificada, cuyos huevos no se empollaron. Se rompieron los huevos y se separaron en yema de huevo y clara de huevo automáticamente. Como material de partida, se usaron 3000 l de clara de huevo que se homogeneizaron preferiblemente por agitación, se mantuvieron a 5 a 10°C, se rellenaron en condiciones estériles en bolsas de polietileno y se sellaron después de la expulsión de las burbujas de aire atrapadas. Estas bolsas de polietileno podían tener un volumen de entre 1 y 50 l, preferiblemente de 5 a 20 l cada una. Se dispusieron las bolsas en una cámara de alta presión (NC-Hyperbaric, España). Usando agua como medio de presurización, se aumentó la presión a 6000 bar al cabo de 10 a 20 minutos. Después de un tiempo de espera de 3 a 5 minutos, respectivamente, se liberó la presión abriendo una válvula de liberación.

15 Se determinó la contaminación bacteriana por siembra de dilución estándar en medio completo y recuento después de cultivo en incubadora a 37°C durante 48 h.

El análisis microbiológico mostró que el tratamiento de alta presión tanto durante 3 minutos como 5 minutos daba como resultado una reducción drástica de la contaminación bacteriana, y también la etapa posterior de liofilización reducía adicionalmente la contaminación bacteriana.

20 Tabla 1: Contaminación bacteriana medida como UFC/g

Muestra	Salmonella en muestra de 25 g	Recuento celular total (UFC/g)
Yema de huevo líquida bruta	Negativa	1,5 x 10 ⁵
Yema de huevo líquida después de 6000 bar, 3 min	Negativa	50
Yema de huevo líquida después de 6000 bar, 5 min	Negativa	50
Yema de huevo liofilizada después de 6000 bar, 3 min	Negativa	40
Yema de huevo liofilizada después de 6000 bar, 5 min	Negativa	<10
UFC= unidades de formación de colonias (microorganismos viables)		

Se separó una fracción que contiene folistatina del huevo tratado a alta presión añadiendo ácido láctico acuoso 12 M hasta que la mezcla estuvo blanca a pH 5,5 mantenida a aproximadamente 5°C. El precipitado, que era visible, se sedimentó por centrifugación a 1000 x g durante 5 min y formó la fracción que contiene folistatina, el sobrenadante se desechó. Se tamponó opcionalmente la fracción que contiene folistatina a pH 8,5 para solubilizar la proteína.

25 Posteriormente, se liofilizó la fracción que contiene folistatina, como precipitado sedimentado o como proteína solubilizada, congelando y aplicando vacío para extraer el agua, mientras se controla la temperatura de la fracción para no superar preferiblemente los 10°C, preferiblemente 5°C, preferiblemente manteniendo la fracción en estado congelado.

30 En la fracción que contiene folistatina liofilizada, el contenido de folistatina activa con relación a la concentración de proteína total era el mismo que en la clara de huevo líquida después del tratamiento de alta presión. Esto muestra que la etapa de liofilización no afecta sustancialmente a la actividad de folistatina, p.ej. la liofilización no reduce sustancialmente la concentración de folistatina activa por contenido de proteína total.

Ejemplo 2: Producción de una fracción de clara de huevo conservada que contiene folistatina activa

35 Se usaron huevos de gallina (*Gallus domesticus*) fertilizados obtenidos de una estación de cría certificada, cuyos huevos no se empollaron. Se rompieron los huevos y se separaron en yema de huevo y clara de huevo automáticamente. Se usaron como material de partida 3000 l de clara de huevo que se homogeneizaron preferiblemente por agitación y se mantuvieron a 5 a 10°C. Se añadió ácido láctico acuoso 12 M a la clara de huevo con agitación hasta alcanzar un pH de 5,5. En un método alternativo, se fermentó la clara de huevo usando bacterias de ácido láctico añadidas para minimizar el contenido de azúcar reductor. En ambos métodos, se formó un precipitado que se sedimentó por centrifugación a 1000 x g durante 5 min.

40 Previamente a la conservación, se solubilizó opcionalmente el precipitado elevando el pH a 8,5 usando tampón, p.ej. tampón TrisHCl, NaOH o carbonato.

En una alternativa adicional, se generó el precipitado añadiendo KCl a una concentración final de aprox. 0,25 M a la clara de huevo, seguido de la misma centrifugación. Previamente a la conservación, se solubilizó opcionalmente el precipitado por dilución usando tampón, p.ej. tampón carbonato a pH 8,5.

5 Se sometió el precipitado, opcionalmente solubilizado, a tratamiento de alta presión en bolsas y se liofilizó entonces usando las condiciones descritas en el Ejemplo 1.

Como alternativa, se sometió el precipitado, preferiblemente solubilizado y diluido en tampón acuoso, a tratamiento con campo eléctrico por pulsos usando las condiciones descritas en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3: Producción de clara de huevo liofilizada que contiene folistatina activa usando tratamiento con campo eléctrico por pulsos

10 Se trató una alícuota de la clara de huevo líquida bruta usada en el Ejemplo 1 a un caudal de 30 l/h a 30°C con un campo eléctrico por pulsos (CEP) de una intensidad de campo de 12 kV/cm usando pulsos positivos unipolares que tienen una duración de pulso de 10 μ s a una tasa de repetición de 200 Hz. A una entrada de energía de 50 a 140 kJ/kg, se redujo la contaminación bacteriana viable por un factor de 10 y 630 UFC, respectivamente, determinado por siembra por dilución.

15 Usando PAGE-SDS, se encontró una reducción de la folistatina activa de aprox. un 15% o una actividad residual de folistatina del 85% basada en la clara de huevo bruta. No se observó desnaturalización térmica de la clara de huevo líquida por PAGE-SDS.

20 Se separó una fracción que contiene folistatina de la clara de huevo tratada con CEP añadiendo ácido láctico acuoso 12 M hasta que la mezcla estuvo blanca a pH 5,5, mientras se mantenía aproximadamente a 5°C. El precipitado, que era visible, se sedimentó por centrifugación a 1000 x g durante 5 min y formó la fracción que contiene folistatina, el sobrenadante se desechó. Se tamponó opcionalmente la fracción que contiene folistatina a pH 8,5 para solubilizar proteína.

25 Posteriormente, se liofilizó la fracción que contiene folistatina, en forma de precipitado sedimentado o de proteína solubilizada, por congelación y aplicación de vacío para extraer el agua, mientras se controla que la temperatura de la fracción no supera los 10°C, preferiblemente los 5°C, preferiblemente manteniendo la fracción en estado congelado.

Ejemplo 4: Concentración de huevo entero, clara de huevo o yema de huevo por separación

30 Se repitió el proceso de los Ejemplos 1, 2 y 3, con la alteración de que antes del tratamiento de alta presión la yema de huevo era el material de partida, que se separó por centrifugación a 3343 x g durante 20 min en una fracción de alta densidad que se recogió como sedimento y una fracción sobrenadante de baja densidad. La fracción de alta densidad se encontró rica en folistatina.

Como alternativa, se separó huevo entero o clara de huevo por centrifugación a 3343 x g durante 20 min en una fracción de alta densidad que se recogió como sedimento y una fracción sobrenadante de baja densidad. De nuevo, se encontró la fracción de alta densidad rica en folistatina.

35 El análisis del contenido de folistatina se muestra a continuación:

Fracción	Folistatina [μ g/kg]
Clara de huevo previamente a la centrifugación	15
Clara de huevo sedimentada	33
Huevo entero previamente a la centrifugación	23
Huevo entero sedimentado	41
Yema de huevo previamente a la centrifugación	4
Yema de huevo sedimentada	36

Estos resultados muestran que la separación de yema de huevo, huevo entero o clara de huevo en una fracción de mayor densidad, correspondiente a membranas de yema de huevo y chalazas, da como resultado una concentración aumentada de folistatina, cuya fracción después de la etapa de conservación, preferiblemente con secado posterior, procura una composición que tiene una concentración de folistatina aumentada.

40 Opcionalmente, la yema de huevo, huevo entero o clara de huevo previamente a la separación no se homogeneizó,

5 p.ej. la yema de huevo, huevo entero o clara de huevo se pasó a través de un tamiz amplio o se agitó para solo romper la membrana de yema de huevo para permitir salir la yema de huevo, preferiblemente sin romper la membrana de yema de huevo o chalazas en trozos pequeños. La membrana de yema y/o chalazas podían separarse opcionalmente del material de partida simultáneamente a la sedimentación de la fracción de proteína soluble que contiene folistatina precipitada.

A partir de la fracción de alta densidad, se concentró la fracción que contiene folistatina por precipitación y concentración, que se sometió entonces a la etapa de conservación usando las condiciones de proceso descritas en los Ejemplos 1 a 3.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir una composición que contiene folistatina biológicamente activa que comprende la etapa de proporcionar un material de partida seleccionado de yema de huevo, huevo entero o clara de huevo líquido bruto originario de huevos de ave y/o suero sanguíneo animal bruto y someter al menos una fracción del material de partida a una etapa de conservación mientras se mantiene la temperatura a o por debajo de 38°C, caracterizado por concentrar una fracción de proteína que contiene folistatina de la proteína soluble del material de partida mediante precipitación de una fracción de proteína soluble que contiene folistatina y separación de la fracción precipitada, y porque posteriormente a la separación de la fracción que contiene folistatina del material de partida, se somete la fracción que contiene folistatina a la etapa de conservación, sometiendo el material de partida a un tratamiento de alta presión de al menos 4500 bar durante al menos 1 min, o sometiendo en primer lugar el material de partida a un tratamiento con campo eléctrico por pulsos de al menos 5 kV/cm, y separando entonces la fracción que contiene folistatina del material de partida conservado por precipitación de una fracción de proteína soluble que contiene folistatina y separación de la fracción precipitada, proporcionando una fracción que contiene folistatina conservada del material de partida.
2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque la precipitación es por acidificación y/o adición de sal hidrosoluble y/o adición de un disolvente.
3. Proceso según la reivindicación 2, caracterizado porque el material de partida es clara de huevo y la acidificación es a pH 6 a pH 5.
4. Proceso según la reivindicación 3, caracterizado porque la acidificación es por fermentación del material de partida mientras se reduce la concentración de azúcar por adición de bacterias productoras de ácido.
5. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la etapa de conservación consiste en tratamiento de alta presión, en el que la fracción que contiene folistatina posteriormente a su separación del material de partida se rellena en envases, se sellan los envases y se someten a alta presión.
6. Proceso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la etapa de conservación consiste en someter el material de partida a un tratamiento con campo eléctrico por pulsos por un campo eléctrico de 5 a 40 kV/cm.
7. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por secar el material de partida conservado, p.ej. por liofilización o por secado en lecho fluidizado.
8. Proceso según la reivindicación 7, caracterizado porque entre la etapa de tratamiento de alta presión y la etapa de liofilización, se transporta el material de partida conservado a envases sellados en que se somete el material de partida bruto al tratamiento de alta presión.
9. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la clara de huevo líquida bruta se proporciona abriendo huevos de ave fertilizados y separando la yema de huevo de la clara de huevo.
10. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el material de partida bruto previamente a la etapa de conservación se enfría a una temperatura máxima de 10°C.
11. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el material de partida bruto previamente a la etapa de conservación se desgasifica.
12. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la yema de huevo, huevo entero o clara de huevo líquido bruto, previamente o simultáneamente a la concentración hasta una fracción que contiene folistatina a partir de la proteína soluble del material de partida, se concentra a una fracción que contiene membrana que contiene la membrana de yema de huevo y/o chalazas.
13. Proceso según la reivindicación 12, en el que la fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o chalazas es la fracción de alta densidad obtenida por centrifugación y/o la fracción de mayor tamaño obtenida por separación por tamaño.
14. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la yema de huevo, huevo entero o clara de huevo bruto líquido previamente a la etapa de conservación se diluye con un diluyente y se concentra entonces a una fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o chalazas.
15. Proceso según la reivindicación 14, en el que la fracción que contiene la membrana de yema de huevo y/o chalazas es la fracción de alta densidad obtenida por centrifugación y/o la fracción de mayor tamaño obtenida por separación por tamaño.
16. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque posteriormente a la etapa de conservación, se seca el material de partida conservado y posteriormente se mezcla con una solución de un azúcar, un alcohol de azúcar y/o un polímero de azúcar y se seca para encapsular la yema de huevo, huevo entero o clara

de huevo líquido.

- 5 17. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque posteriormente a la etapa de conservación, se mezcla el material de partida conservado con yema de huevo, huevo entero o clara de huevo conservado originario de huevos de ave no fertilizados para obtener una concentración predeterminada de folistatina en la mezcla.
18. Proceso según la reivindicación 17, caracterizado porque el material de partida conservado es clara de huevo, que se seca previamente a mezclar con yema de huevo, huevo entero o clara de huevo conservado térmicamente originario de huevos de ave no fertilizados, que se seca previamente al mezclado.
- 10 19. Proceso según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la folistatina precipitada se solubiliza del precipitado separado previamente a o después de la conservación.