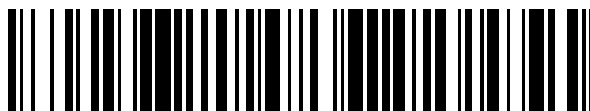


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 725**

51 Int. Cl.:

A23L 7/10 (2006.01)

A23L 11/30 (2006.01)

A23L 33/00 (2006.01)

A23L 33/17 (2006.01)

A23L 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.02.2013 PCT/EP2013/052097**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13113908**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.02.2013 E 13703014 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2809178**

54 Título: **Método de preparación de un alimento hipoalergénico**

30 Prioridad:

02.02.2012 FR 1250977

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2018

73 Titular/es:

SOCIETE FINANCIERE CORMOULS HOULES (33.3%)

Parc d'activités du Cassé 2, 13-15 Rue Jean Monnet, BP 14246

31240 Saint-Jean, FR;

UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (33.3%) y

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)

72 Inventor/es:

BRUNET, ETIENNE;

BARRE, ANNICK;

CAZE-SUBRA, STÉPHANIE;

CORMOULS-HOULES, NICOLAS;

LE MOUEL, VINCENT y

ROUGÉ, PIERRE

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 2 683 725 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

Método de preparación de un alimento hipoalergénico

La presente invención se inscribe en el campo de la preparación de alimentos hipoalergénicos. Se refiere a un método de preparación de un alimento con alergenicidad reducida a partir de una matriz alimentaria sólida con mayor alergenicidad, tal como se define en las reivindicaciones.

En la actualidad la Organización Mundial de la Salud clasifica las alergias en el 3^{er} puesto mundial de las enfermedades crónicas más extendidas. En los países industrializados, se calcula que afectan a uno de cada tres personas, y una proporción de una persona con respecto a dos podría ser posible hacia 2030 si el aumento de casos de alergia registrados durante los últimos diez años continúa al mismo ritmo. Las alergias alimentarias representan aproximadamente un 5 % de las alergias y hasta un 10 % en los niños. Desde hace varios años están aumentando constantemente.

En particular, las alergias a los cacahuetes y a los frutos secos (nuez, avellana, anacardo, nuez pacana, pistacho, etc.) ocupan un lugar importante en la clase de alergias alimentarias debido a su alta prevalencia y especialmente a su gravedad. Con frecuencia se traducen en edemas bucarofaríngeos o shocks anafilácticos generalizados. Por consiguiente, estas alergias exigen el cumplimiento de un régimen alimentario estricto en el que se excluyan todos los productos susceptibles de contener cacahuetes o frutos secos. Algunas regulaciones europeas o internacionales requieren la mención de la presencia de estos productos en el etiquetado de los alimentos. Los alérgenos principales implicados en estas alergias corresponden esencialmente a proteínas de reserva, que se acumulan en cantidades apreciables en las semillas en maduración, que son inseparables de la semilla. Durante la germinación de la semilla, estas proteínas de reserva tienen el papel de proporcionar a la planta joven los aminoácidos necesarios para su crecimiento.

En la presente memoria se definen como alérgenos principales los alérgenos para los cuales al menos un 50 % de las personas alérgicas poseen los anticuerpos IgE correspondientes. Hasta la fecha se ha identificado la mayor parte de los alérgenos proteicos principales en cacahuetes y frutos secos. Estos alérgenos principales corresponden esencialmente a vicilinas, leguminosas y albúminas 2S.

Por ejemplo, hasta la fecha, se han identificado once proteínas alérgicas diferentes en el cacahuete, denominadas Ara h 1 a Ara h 11. Entre ellas, Ara h 1 (vicilina con un peso molecular de 63,5 kDa) y Ara h 2 (albúmina 2S con un peso molecular de 16-17 kDa) representan aproximadamente de aproximadamente un 12 a un 16 % y de un 6 a un 9 %, respectivamente, de proteínas del cacahuete. Más de un 95 % de las personas alérgicas al cacahuete presentan anticuerpos IgE específicos para estas dos proteínas. Ara h 3, una leguminosa, también se ha identificado como un alérgeno principal del cacahuete.

La técnica anterior ha propuesto diferentes métodos para reducir el grado de alergenicidad de los alimentos a base de materias primas altamente alérgicas, de forma específica a base de cacahuete.

A modo de ejemplo se pueden mencionar la mejora genética, mediante selección cruzada de variedades de bajo nivel de alérgenos o la producción de cacahuetes genéticamente modificados con bajo contenido de alérgenos. Estas técnicas, sin embargo, no dan resultados satisfactorios, en la medida en que la síntesis y la acumulación de los principales alérgenos del cacahuete obedecen a sistemas multifactoriales cuya expresión es difícil de modificar. Además, la modificación mediante técnicas de ingeniería genética se enfrenta al problema del uso de organismos genéticamente modificados en el campo de la agroalimentación.

También se han propuesto diversos métodos de tratamiento fisicoquímico de semillas de cacahuete, pero, hasta la fecha, ninguno ha proporcionado resultados concluyentes, especialmente en el caso de los tratamientos con calor (Davis *et al.*, 1998), por radiación UV (Chung *et al.*, 2008), por proteasas digestivas tales como tripsina o pepsina (van Boxtel *et al.*, 2008) o por adición de otros compuestos, tales como agentes formadores de complejos, por ejemplo, ácido fítico (Chung *et al.*, 2007).

De otro modo con la técnica anterior, de forma específica en la publicación científica de Kato *et al.* (Kato, 2000), o en los documentos de patente WO 92/11772, JP 3.653.132 y US 5 476 677, se han propuesto métodos para reducir la alergenicidad de ciertas semillas, más particularmente arroz y cereales, por tratamiento de estas semillas mediante presurización hidrostática, con el objeto de liberar las proteínas alérgicas contenidas en las mismas. Estos métodos, sin embargo, no permiten liberar más que una parte de estas proteínas alérgicas, tanto más baja cuando estas últimas están poco disponibles en la naturaleza para la extracción, ya que están presentes en las semillas en forma de cuerpos proteicos compactos.

La presente invención tiene como objetivo solucionar los inconvenientes de los métodos para la preparación de alimentos de alergenicidad reducida propuestos por la técnica anterior, de forma específica los que se han descrito anteriormente, proponiendo un método tal que permita obtener, a partir de una matriz alimentaria sólida que presenta naturalmente una alergenicidad elevada, un alimento de alergenicidad fuertemente reducida, o incluso nula.

Un objeto adicional de la invención es que este método, además de ser compatible con los alimentos, no es contaminante, y de forma específica que usa ningún disolvente ni aditivo ionizante, de modo que se respecta totalmente no solo la seguridad, sino también las propiedades gustativas y nutricionales de la matriz alimenticia inicial.

5 Para este fin, según la presente invención se propone un método para preparar un alimento con alergenicidad reducida a partir de una matriz alimentaria sólida con partículas con una alergenicidad más elevada, que contiene proteínas alergénicas. Este método comprende una etapa de tratamiento de una dispersión de la matriz alimentaria sólida en un vehículo acuoso, por homogeneización a alta presión, de preferencia a presión ultra elevada, es decir, en condiciones hidrodinámicas, con el fin de obtener un homogenado constituido por una dispersión de proteínas
10 alergénicas contenidas inicialmente en la matriz, en mezcla con partículas sólidas de la matriz. De forma ventajosa, esta etapa permite extraer de la matriz casi todas las proteínas alergénicas que estaban inicialmente contenidas en la misma, y de forma específica los alérgenos principales.

Por "con partículas", en la presente memoria se hace referencia a que el material alimentario sólido está formado por partículas, sin limitación de tamaño para estas partículas. Por lo tanto, el término partículas engloba en la presente
15 memoria las semillas, granos, nueces, etc., enteros, sea cual sea su tamaño. Este término también engloba por ejemplo las células, orgánulos celulares, etc.

Par matriz alimentaria sólida, se hace referencia a una materia prima comestible en forma sólida, de forma específica de origen vegetal, o un derivado sólido de tal materia prima. Preferiblemente, la matriz alimentaria sólida es una, o es a base de una, materia prima sin procesar, es decir, que no se ha sometido a ninguna etapa de
20 purificación o de separación de sus componentes. De forma más particular, la matriz alimentaria sólida puede estar constituida por granos alimentarios que presentan una alergenicidad, de forma específica granos de cacahuete y/o de frutos denominados secos tales como nueces, avellanas, anacardos, nueces pacanas, nueces de macadamia, nueces de Brasil, pistachos, almendras, piñones, castañas, etc.

La matriz alimentaria también puede estar constituida por otros productos distintos a los denominados frutos secos, tales como manzanas, uvas, etc., estos últimos pudiendo haberse sometido a etapas de transformación previamente a la realización del método según la invención, por ejemplo de pelado, troceado, recorte, etc.

En el caso en donde la matriz alimentaria sólida es a base de cacahuete, se trata de granos sin procesar.

Es lo mismo en los casos donde la matriz alimentaria es a base de frutos secos, entonces la matriz consiste en frutos secos sin procesar.

30 La alergenicidad se define en la presente memoria de forma clásica en sí misma, como la capacidad de una sustancia para provocar una reacción alérgica, es decir, una reacción problemática del sistema inmunitario en algunos de todos que muestran una hipersensibilidad con respecto a esta sustancia. La reacción alérgica pone en juego varios anticuerpos, entre ellos las inmunoglobulinas E (IgE), una clase específica de inmunoglobulinas secretadas por los linfocitos B. En presencia del alérgeno, sustancia biológica o química reconocida por el sistema
35 inmunitario humano que provoca una reacción o una respuesta alérgica, el anticuerpo desencadena la liberación de mediadores químicos que causan la reacción alérgica, que se puede traducir en diversos síntomas más o menos graves, tales como pruritos, erupciones cutáneas, dificultad para respirar, vómitos, diarrea, un edema bucarofaríngeo o reacción anafiláctica generalizada (choque anafiláctico).

La técnica de homogeneización a alta presión que se usa en el contexto de la presente invención es conocida por sí misma, y consiste en proyectar a caudal constante un producto líquido o pastoso, a alta presión, por lo general entre 30 y 40000 bares (3 y 4000 MPa), a través de un cabezal de homogeneización, a través de un espacio de varios μm dejado libre por una válvula de contrapresión. La presión corriente arriba de esta válvula se vuelve muy fuerte, y la descompresión repentina corriente abajo de la válvula provoca fenómenos que causan una modificación en el producto disperso, de forma específica fenómenos de cizallamiento, microturbulencia y cavitación. En particular se describe que esta técnica permite estabilizar emulsiones grasas u obtener granulometrías pequeñas en el seno de una emulsión o una dispersión de sólidos en una fase líquida. Su modo de operación detallado se describe de forma específica en la publicación de Lecluse, 1979.

De forma inesperada, los presentes inventores han descubierto en la actualidad que el tratamiento por homogeneización a alta presión de una dispersión en un vehículo acuoso de una matriz alimentaria sólida emite
50 solubilizar las proteínas alergénicas contenidas en esta matriz, incluyendo cuando, como en el caso de las semillas de cacahuete sin procesar, estas proteínas alergénicas están naturalmente poco disponibles para la extracción, ya que están incluidas en la matriz en forma de cuerpos proteicos compactos.

Esta etapa de tratamiento, realizada en condiciones hidrodinámicas, por proyección de la dispersión de la matriz alimentaria a alta presión a través de un cabezal de homogeneización, resulta de forma específica mucho más ventajosa que los tratamientos simples de presurización, en condiciones hidrostáticas, propuestos por la técnica anterior, en términos de cantidad de proteínas alergénicas extraídas de la matriz.

Un tratamiento posterior del homogenado obtenido, por degradación de estas proteínas alergénicas, permite de forma ventajosa obtener, directamente o después de la transformación, un producto alimentario hipoalergénico, que conserva intactas las propiedades gustativas y nutricionales iniciales de la matriz alimentaria.

5 El término hipoalergénico se usa en la presente memoria, en referencia a un alimento, como significan una tendencia menor a provocar una reacción alérgica, con respecto a la matriz alimentaria que sirve de base para su preparación. En modos de realización de la invención, el método de preparación de un alimento que incluye una etapa de tratamiento por homogeneización a alta presión de la matriz alimentaria sólida constituida por granos de cacahuete sin procesar o frutos secos sin procesar, permitió obtener una solubilización importante, superior a un 95 %, de las proteínas alergénicas contenidas inicialmente en la matriz. En particular, en el caso de los granos de cacahuete, las tres proteínas alergénicas principales, Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3, se solubilizan de ese modo de forma ventajosa casi totalmente en el vehículo acuoso. A partir de ello resulta, después de una etapa posterior de degradación de estas proteínas, una disminución significativa, hasta más de un 90 %, de la alergenicidad de estas proteínas alergénicas.

15 En la presente memoria no se anticiparán mecanismos que sean la base de un resultado ventajoso de ese tipo. En el caso particular de los granos de cacahuete, las proteínas alergénicas se almacenan en las vacuolas del grano que, una vez saturadas, se deshidratan a continuación para formar los cuerpos proteicos. Esta deshidratación conduce a un empaquetado de las proteínas que se colocan entonces en estructuras pseudo-cristalinas, que las hacen por lo tanto poco disponibles para la extracción de los tampones usados normalmente para solubilizar las proteínas. Se puede suponer que el tratamiento por homogeneización a alta presión, mediante una desestructuración de la matriz alimentaria sólida, aumenta la disponibilidad y el grado de solvatación de estas proteínas, así como su susceptibilidad a experimentar modificaciones biológicas y químicas que tienen como objeto su desnaturalización y degradación.

20 La alergenicidad del alimento obtenido se puede evaluar con cualquier medio conocido por el experto en la técnica, de forma específica mediante cuantificación de su contenido de alérgenos principales mediante dosificaciones inmunológicas, por ejemplo con la técnica conocida con el nombre de ELISA (para el inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), Por medio de anticuerpos específicos de estos alérgenos.

Siguiendo modos de realización preferidos, la invención responde además a las siguientes características, realizadas por separado o en cada una de sus combinaciones técnicamente operativas.

30 En particular, la elección de los parámetros de operación preferidos se realiza con el fin de obtener el mejor rendimiento de extracción de las proteínas alergénicas contenidas en la matriz alimentaria sólida durante la etapa de homogeneización a alta presión.

35 En modos de realización de la invención, la matriz alimentaria sólida se somete a una etapa de trituración previamente a la etapa de tratamiento por homogeneización a alta presión, de preferencia después de su dispersión en el vehículo acuoso. Una característica de ese tipo mejora de forma ventajosa el rendimiento de extracción de las proteínas alergénicas contenidas en la matriz, de forma específica en los casos en los que la matriz está formada inicialmente por semillas o granos enteros de diámetro relativamente elevado.

Preferiblemente, esta trituración se realiza con el fin de obtener una granulometría de la matriz sólida inferior a 1500 μm , de diámetro de las partículas que la forman.

40 En este sentido, se puede realizar de forma específica en una mezcladora de rotor, clásica en sí misma, que permite, gracias a fuerzas de cizallamiento, reducir la granulometría de la matriz sólida y dispersar aproximadamente las partículas sólidas en el vehículo acuoso.

La trituración se puede realizar a una temperatura comprendida entre 15 y 90 $^{\circ}\text{C}$, de preferencia aproximadamente igual a 25 $^{\circ}\text{C}$. La velocidad del rotor se puede regular a un valor comprendido entre 100 y 10 000 vueltas/minuto, de preferencia a aproximadamente 800 vueltas/minuto. La duración de la trituración puede estar comprendida entre 2 y 60 minutos, y es preferiblemente de aproximadamente 10 minutos.

45 En modos de realización particulares de la invención, la dispersión de la matriz alimentaria sólida en el vehículo acuoso comprende una proporción en peso de matriz alimentaria sólida, por volumen de vehículo acuoso, comprendida entre 50/50 y 5/95, y de preferencia igual a 20/80.

El vehículo acuoso es preferiblemente agua.

50 La etapa de tratamiento por homogeneización a alta presión se realiza a una presión comprendida entre 200 y 1000 bares (20 y 100 MPa), preferiblemente a aproximadamente 500 bares (50 MPa).

La homogeneización a alta presión se realiza a una temperatura comprendida entre 15 y 90 $^{\circ}\text{C}$, preferiblemente a aproximadamente 35 $^{\circ}\text{C}$.

En modos de realización preferidos de la invención, la etapa de tratamiento por homogeneización a alta presión se realiza con el fin de obtener una granulometría del homogenado inferior a 20 μm , de preferencia aproximadamente

Igual a 10 µm, de diámetro de las partículas que lo componen. La obtención de una granulometría de ese tipo está asociada de forma ventajosa con un rendimiento óptimo de extracción de las proteínas alergénicas de la matriz. Además es compatible con los homogeneizadores de alta presión que normalmente se proponen en el mercado.

5 Un solo ciclo de homogeneización a alta presión generalmente suficiente para obtener un rendimiento de extracción de las proteínas alergénicas de la matriz alimentaria sólida superior a un 95 %, sea cual sea el estado inicial de estas proteínas en la matriz.

Al final de esta etapa de homogeneización a alta presión se obtiene una dispersión exenta de cualquier partícula que se pueda detectar a simple vista, que conserva el sabor inicial de la matriz alimentaria sólida de partida.

10 En modos de realización preferidos de la invención, la etapa de tratamiento por homogeneización a alta presión va seguido por una etapa de tratamiento del homogenado obtenido por un agente de degradación/desnaturalización de las proteínas, para degradar las proteínas alergénicas contenidas en el homogenado y disminuir de ese modo su alergenicidad, de preferencia de al menos un 70 %, preferiblemente de al menos un 90 %, e incluso preferiblemente de al menos un 95 %.

15 El agente de degradación de las proteínas puede ser un agente químico o biológico, de forma específica un agente proteolítico, que se puede obtener a partir de un microorganismo, y de forma específica una proteasa. Los agentes biológicos son de forma específica particularmente preferidos en el contexto de la invención.

20 El agente de degradación de las proteínas puede ser un microorganismo, cuya actividad enzimática, proteolítica de forma específica, puede ser superior a la de las enzimas aisladas, y de preferencia un microorganismo probiótico. Con el término probiótico, se hace referencia a designar microorganismos vivos que, cuando se integran en cantidad suficiente, ejercen un efecto positivo en la salud, más allá de los efectos nutricionales normales.

De ese modo se evita de forma ventajosa el recurso a agentes o disolventes químicos, para esta etapa de la preparación del alimento hipoalergénico.

Los microorganismos seleccionados según la invención pueden ser bacterias u hongos, unicelulares tales como las levaduras o pluricelulares.

25 Preferiblemente, se eligen con el fin de que presenten propiedades organolépticas de modo que no alteren las cualidades gustativas iniciales del homogenado.

Los ejemplos de especies de bacterias que se pueden usar en el contexto de la invención son *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus subtilis*. Los ejemplos de hongos son *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* y *Aspergillus oryzae*.

30 Uno o varios microorganismos de especies o de géneros diferentes se pueden usar de forma simultánea o de forma consecutiva.

35 En modos de realización preferidos de la invención, el microorganismo se inocula en el homogenado, y el medio obtenido de ese modo se deja fermentar durante un periodo de tiempo suficiente como para disminuir al menos en un 70 %, de preferencia al menos en un 90 %, la alergenicidad de las proteínas alergénicas contenidas inicialmente en el homogenado.

La cantidad inicial de microorganismos usada para la inoculación y las condiciones de fermentación se determinan de forma específica en función de la matriz alimentaria sólida de partida y de las proteínas alergénicas que incluye.

40 Preferiblemente, cuando el microorganismo es un hongo, la inoculación se realiza a razón de $1 \cdot 10^4$ a $1 \cdot 10^8$ esporas por ml de homogenado. Cuando el microorganismo es una bacteria, la inoculación se realiza por ejemplo por medio de un cultivo bacteriano de densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,5, que se añade en el homogenado en una concentración de un 10 a un 70 % en volumen, preferiblemente de aproximadamente un 50 % en volumen. Una elección de las condiciones de inoculación de ese tipo permite de forma ventajosa obtener la mejor actividad de degradación de las proteínas alergénicas contenidas en el homogenado por el microorganismo.

45 La fermentación se puede realizar en un sistema aireado, con una agitación orbital, bajo una temperatura comprendida entre 20 y 45 °C, de preferencia de aproximadamente 37 °C, de 2 a 300 horas, de preferencia durante aproximadamente 72 horas.

Antes de la inoculación, el homogenado se lleva de preferencia a una temperatura superior o igual a 100 °C, de 10 a 30 minutos, a continuación se enfría a la temperatura ambiente.

50 En modos de realización de la invención, al homogenado se le añade azúcar, por ejemplo sacarosa, glucosa, maltosa; almidón, por ejemplo de trigo, de maíz, de patata, en una concentración comprendida entre un 0,5 y un 10 % en peso/volumen; y/o ácido, tal como ácido acético, antes de la fermentación, con el fin de favorecer la actividad enzimática, proteolítica de forma específica, del microorganismo.

- Más generalmente, la etapa de tratamiento por un microorganismo probiótico, con el fin de disminuir la alergenicidad de las proteínas alergénicas contenidas en una matriz sólida, se puede realizar bajo cualquier forma de esta matriz sólida, comprendida en la misma en formas que no se hayan sometido a homogeneización a alta presión, pero que se hayan sometido a cualquier otro tipo de tratamiento previo, o a ningún tratamiento previo de ese tipo. En particular, esta etapa de tratamiento por un microorganismo probiótico se puede realizar sobre una dispersión de partículas y proteínas obtenidas a partir de la matriz sólida, obtenida mediante una técnica distinta a la homogeneización a alta presión. Las características de esta etapa de tratamiento por un microorganismo probiótico entonces pueden ser tal como se han descrito anteriormente.
- La fracción de fermentado obtenida al final de la fermentación se puede usar de forma ventajosa como alimento como tal, o como compuesto intermedio para la fabricación de alimentos.
- Por ejemplo, en el caso en el que la matriz alimentaria sólida inicial está constituida a base de cacahuete, la fracción de fermentado se puede incorporar, después de una deshidratación opcional, en el aceite de cacahuete, de forma específica refinado, que no presenta en sí misma carácter alergénico, para la preparación de mantequilla de cacahuete.
- El alimento final presenta una alergenicidad fuertemente reducida con respecto a la matriz alimentaria sólida inicial, las ser esta reducción superior hasta un 95 %. Sus cualidades gustativas, organolépticas y nutricionales son similares a las de esta matriz.
- El método según la invención constituye un avance principal en la gestión diaria de las exclusiones alimentarias impuestas a los individuos alérgicos en los problemas que están relacionados con los mismos, que se refieren de forma específica al etiquetado de los productos alimentarios.
- Las características y ventajas del método según la invención aparecerán de forma más clara a la vista de los ejemplos de realización que siguen a continuación, proporcionado simplemente a modo ilustrativo y no limitantes de la invención, con el apoyo de las figuras 1 a 10, en las que:
- la figura 1 representa una microfotografía con un aumento de 20x de de y obtenidas por una trituración de granos de cacahuete crudos según modos de realización particulares de la invención;
 - la figura 2 muestra una microfotografía con un aumento de 20x de partículas de un homogenado obtenido a partir de granos de cacahuete crudos según un modo de realización particular del método según la invención;
 - la figura 3 es un histograma que muestra la masa en mg de proteínas dosificadas en una suspensión de 100 mg de granos de cacahuete crudos, respectivamente antes y después de una etapa de homogeneización según un modo de realización particular de la invención;
 - la figura 4 muestra un gel SDS-PAGE (del inglés Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) coloreado con Azul de Coomassie, obtenido después de migración de, Pista 1 un marcador de peso molecular, Pista 2 un extracto de suspensión de granos de cacahuete después de trituración y antes de homogeneización a alta presión, y Pista 3 un extracto de suspensión de granos de cacahuete después de homogeneización a alta presión según modos de realización particulares de la invención;
 - la figura 5 muestra un gel SDS-PAGE coloreado con Azul de Coomassie, obtenido después de migración de, Pista 1 un marcador de peso molecular; Pista 2 un extracto proteico sin procesar de granos de cacahuete crudos no tratados; Pistas 3 a 5, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete crudos mediante etapas de trituración, homogeneización a alta presión después de 72 horas de fermentación por *Rhizopus oligosporus*, según un modo de realización particular del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 3, Fracción soluble para la Pista 4 y Fracción insoluble para la Pista 5 (deposición de 20 µg de proteínas por pocillo);
 - la figura 6 representa un gel SDS-PAGE seguido por una transferencia de Western obtenido después de migración de, Pista 1 un extracto proteico sin procesar de granos de cacahuete crudos no tratados; Pistas 2 a 4, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete crudos mediante etapas de trituración, homogeneización a alta presión después de 72 horas de fermentación por *Rhizopus oligosporus*, según un modo de realización particular del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 2, Fracción soluble para la Pista 3 y Fracción insoluble para la Pista 4 (deposición de 20 µg de proteínas por pocillo, combinación de anticuerpos de conejo anti-Ara h 1, anti-Ara h 2, anti-Ara h 3); el marcador de peso molecular se representa a la izquierda en la figura;
 - la figura 7 muestra un gel SDS-PAGE coloreado con Azul de Coomassie, obtenido después de migración de, Pista 1 un marcador de peso molecular; Pista 2 un extracto proteico sin procesar de granos de cacahuete crudos no tratados; Pistas 3 a 5, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete crudos mediante etapas de trituración, homogeneización a alta presión después de 72 horas de fermentación por *Aspergillus oryzae*, según un modo de realización particular del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 3, Fracción soluble para la Pista 4 y Fracción insoluble para la Pista 5; Pistas 6 a 8, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete tostados mediante etapas de trituración, homogeneización a alta presión después de 72 horas

de fermentación por *Aspergillus oryzae*, según el mismo modo de realización del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 6, Fracción soluble para la Pista 7 y Fracción insoluble para la Pista 8 (deposición de 20 µg de proteínas por pocillo);

5 - la figura 8 representa un gel SDS-PAGE seguido por una transferencia de Western obtenido después de migración de, Pista 1 un marcador de peso molecular; Pista 2 un extracto proteico sin procesar de granos de cacahuete crudos no tratados; Pistas 3 a 5, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete crudos mediante etapas de trituración, homogenización a presión ultra elevada después de 72 horas de fermentación por *Aspergillus oryzae*, según un modo de realización particular del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 3, Fracción soluble para la Pista 4 y Fracción insoluble para la Pista 5; Pistas 6 a 8, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete tostados mediante etapas de trituración, homogenización a presión ultra elevada después de 72 horas de fermentación por *Aspergillus oryzae*, según el mismo modo de realización del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 6, Fracción soluble para la Pista 7 y Fracción insoluble para la Pista 8 (deposición de 20 µg de proteínas por pocillo, combinación de anticuerpos de conejo anti-Ara h 1, anti-Ara h 2, anti-Ara h 3);

15 - la figura 9 muestra un gel SDS-PAGE coloreado con Azul de Coomassie, obtenido después de migración de, Pista 1, un extracto proteico sin procesar de granos de cacahuete crudos no tratados; Pistas 2 a 4, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete crudos mediante etapas de trituración, homogeneización a alta presión después de 72 horas de fermentación por *Bacillus subtilis*, según un modo de realización particular del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 2, Fracción soluble para la Pista 3 y Fracción insoluble para la Pista 4 (deposición de 20 µg de proteínas por pocillo); el marcador de peso molecular se representa a la izquierda en la figura;

20 - y la figura 10 representa un gel SDS-PAGE seguido por una transferencia de Western obtenido después de migración de, Pista 1 un extracto proteico sin procesar de granos de cacahuete crudos no tratados; Pistas 2 a 4, extractos de proteínas obtenidos a partir de granos de cacahuete crudos mediante etapas de trituración, homogenización a presión ultra elevada después de 72 horas de fermentación por *Bacillus subtilis*, según un modo de realización particular del método según la invención, fracción de Sobrenadante para la Pista 2, Fracción soluble para la Pista 3 y Fracción insoluble para la Pista 4 (deposición de 20 µg de proteínas por pocillo, combinación de anticuerpos de conejo anti-Ara h 1, anti-Ara h 2, anti-Ara h 3); el marcador de peso molecular se representa a la izquierda en la figura.

25 EJEMPLO A - Tratamiento de una matriz alimentaria sólida formada por granos sin procesar de cacahuete por homogeneización a alta presión

1/ Materiales y métodos

30 Para la trituración inicial de la matriz se usa una mezcladora de inmersión a alto cizallamiento Silverson®. La velocidad del rotor se fija a 700 vueltas/minuto, la duración del tratamiento en 5 minutos. La temperatura es de aproximadamente 25 °C.

35 La homogeneización a alta presión se realiza por medio de un homogeneizador a alta presión Lab-1000 de la compañía APV, a una presión de 500 bars (50 MPa), y a una temperatura de 35 °C.

40 El análisis microscópico se realiza sobre una dispersión de la matriz alimentaria sólida, respectivamente después de trituración y después de homogeneización a alta presión. En este sentido, 10 µl de la dispersión se depositan sobre Un portaobjetos de vidrio y se seca a una temperatura de 60 °C durante 10 minutos. Esto permite que los sólidos residuales se adhieran al portaobjetos de vidrio y que se pueda proceder a una coloración. Los portaobjetos se sumergen a continuación en la solución de naranja de acridina a un 1 % (m/v) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con agua destilada, los portaobjetos se sumergen en una solución de rojo Congo a un 1 % (m/v) durante 5 minutos, a continuación se aclara intensamente con agua destilada. Los portaobjetos se sumergen a continuación en una solución de verde luz a un 1 % (m/v) durante 2 minutos y a continuación se aclaran con agua destilada. La observación se realiza a continuación al microscopio con un aumento de 20x, por medio del microscopio Leica DM IRBE invertido de campo grande y de fondo claro. La coloración permite identificar los diferentes compuestos de la dispersión: el almidón se colorea de color violeta, las proteínas de color verde/azul (visible en color gris oscuro en las figuras 1 y 2) y las paredes celulares en color marrón/naranja.

45 El análisis cuantitativo de las proteínas presentes en la dispersión se realiza antes y después del tratamiento por homogeneización a alta presión. En este sentido, a 980 µl de la dispersión (a proporciones idénticas de masa/volumen) se añaden 20 µl de una solución tampón de Tris(2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol) a 1 mol/l a un pH de 8,5, en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Las suspensiones se agitan a continuación en un agitador orbital a temperatura ambiente durante 1 h. Los tubos se centrifugan a 4 °C a una velocidad de 16 100 g durante 10 minutos, y el sobrenadante se extrae. Este sobrenadante se diluye a la 10^a en agua ultra pura, y el análisis cuantitativo de las proteínas se realiza con la ayuda del kit de análisis cuantitativo de proteínas BCA (para el inglés Bi-Cinchoninic Acid, ácido bicinconínico) de Pierce, en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos. La gama patrón es una solución de BSA (para el inglés Bovine Serum Albumin, albúmina de suero bovino) en concentraciones que varían de 2 mg/ml a

0 mg/ml. Después de la incubación de la solución proteica (25 µl después de dilución) y del reactivo del kit (200 µl) Durante 30 minutos a 37 °C, se hace la lectura de la microplaca en un lector espectrofotométrico a una longitud de onda de 562 nm. Las concentraciones de proteína se calculan a partir de la gama patrón.

5 La separación de las proteínas en gel se realiza en gel de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización (SDS-PAGE). Las electroforesis se realizan en geles planos de porosidad de un 12,5 % de acrilamida. Esta malla permite separar bien las proteínas de pesos moleculares medios y bajos (entre 100 y 10 kDa).

10 Los geles están constituidos por un gen de separación (acrilamida al 12,5 %; bis-acrilamida al 0,4 %; 0,125 mol/l de Tris-HCl a pH 8,8; dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1 %) y un gel de concentración (acrilamida al 4,8 %; bis-acrilamida al 0,3 %; 0,375 mol/l de Tris-HCl a pH 6,8; SDS al 0,1 %). La migración se desarrolla a un amperaje constante de 30 mA durante aproximadamente 1 hora.

Las soluciones proteicas se depositan a volumen constante: 1 µl + 19 µl de agua ultra pura + 4 microlitros de una solución de tampón de carga [SDS al 2 %; Tris 0,125 M; glicerol al 10 %; β-mercaptoetanol al 5 %] y se calientan 5 minutos a 100 °C antes de su deposición sobre el gel.

15 Las proteínas separadas sobre geles se colorean a continuación según el siguiente protocolo: fijación en una solución de etanol al 40 %, ácido acético al 10 % y H₂O al 50 % durante 30 minutos; coloración en una solución de Azul de Coomassie (1 g de azul de Coomassie R250, 250 ml de etanol, 80 ml de ácido acético, 670 ml de H₂O); decoloración en una solución de etanol al 25 %, ácido acético al 8 %, H₂O al 67 %, hasta que el fondo del gel sea transparente.

2/ Resultados

20 Los granos de cacahuete sin procesar se ponen en suspensión en agua, en una proporción de peso de granos por volumen de agua igual a 20/80.

Esta suspensión se somete a trituración, según el método que se ha indicado anteriormente. Al final de esta etapa se obtiene una suspensión en agua de partículas de grano de cacahuete.

25 Esta suspensión se somete a análisis microscópico, según el método que se ha indicado anteriormente. Después de la coloración, se obtiene la microfotografía representada en la figura 1. Ahí se observa que todas las partículas sólidas presentan un diámetro inferior a 1500 µm.

La suspensión obtenida se somete a homogeneización a alta presión, según el método que se ha indicado anteriormente (pasaje único en el homogeneizador).

30 El homogenado Obtenidos se somete a análisis microscópico, según el método que se ha indicado anteriormente. Después de la coloración, se obtiene la microfotografía representada en la figura 2. Ahí se observa claramente una desagregación de los cuerpos proteicos, con respecto a la suspensión antes de la homogeneización que forma el objeto de la figura 1. A partir de la gran mayoría de las proteínas alergénicas del cacahuete, de forma específica Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3/4, Ara h 5, Ara h 6, Ara h 8 y Ara h 9, que están contenidas en estos cuerpos proteínicos, se puede deducir que la homogeneización a alta presión condujo a la dispersión de éstas proteínas en el vehículo acuoso.

35 Un análisis cuantitativo de las proteínas contenidas en la suspensión, antes y después de la homogeneización, se realizó según el método que se ha descrito anteriormente. El resultado, en masa de proteínas dosificadas en una suspensión de 100 mg de granos de cacahuete, se muestra en la figura 3.

40 Ahí se observa que después de la homogeneización, para la misma cantidad en peso inicial de grano de cacahuete, Se dosifica una cantidad de proteínas en la suspensión que es de un 42 % más elevada que antes de la homogeneización a alta presión. Este resultado demuestra claramente que la homogeneización a alta presión conduce a una solubilización importante de las proteínas contenidas inicialmente en las partículas de la fracción triturada de granos de cacahuete.

45 Las proteínas contenidas en la suspensión, respectivamente después de la trituración y antes de la homogeneización, y después de la homogeneización a alta presión, se separaron sobre gel de poliacrilamida SDS-PAGE, según el método que se ha indicado anteriormente. Después de la coloración, se obtiene el gel que se muestra en la figura 4. En este gel, la Pista 1 corresponde a un marcador de peso molecular, la Pista 2 a las proteínas de la suspensión antes de la homogeneización y la Pista 3 a las proteínas de la suspensión después de la homogeneización a alta presión. En esta figura, las bandas atribuidas a los alérgenos principales del cacahuete, Es decir, Ara h 1 (de peso molecular de aproximadamente 63 kDa), Ara h 3 (subunidad ácida, duplete con pesos moleculares de aproximadamente 42 y 45 kDa) y Ara h 2 (duplete con pesos moleculares de aproximadamente 16 y 17 kDa) se han indicado con flechas.

50 En esta figura 4 se observa que, para condiciones de operación idénticas, la intensidad de las bandas que corresponde a los alérgenos principales del cacahuete, Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3, es claramente más pronunciado

5 para el extracto proteico obtenido después de la homogeneización a alta presión, que para el obtenido a partir de la fracción triturada antes de la homogeneización. También se observa la presencia, en la Pista 3, de bandas entre 35 y 20 kDa, entre 55 y 45 kDa y más allá de 70 kDa, que no son visibles en la Pista 2. Se puede deducir que la homogeneización a alta presión ha permitido liberar en el vehículo acuoso una cantidad importante de proteínas, y de forma específica los alérgenos principales del cacahuete Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3.

La homogeneización a alta presión por lo tanto permitió mejorar de manera significativa la disponibilidad y el grado de solvatación de las proteínas de reserva contenidas en los granos de cacahuete, y aumentar por la misma su susceptibilidad a experimentar posteriormente un tratamiento, de forma específica biológica, que tiene como objeto su desnaturalización o su degradación.

10 EJEMPLO B - Preparación de anticuerpos dirigidos contra las proteínas alérgicas Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 del cacahuete

Con el fin de cuantificar el contenido de alérgenos principales del homogenado obtenido en el Ejemplo A, se preparan anticuerpos dirigidos contra las proteínas alérgicas Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 del cacahuete de la siguiente forma.

15 1/ Purificación de la proteína Ara h 1

Los granos de cacahuete crudos se dispersan en tampón Tris 20 mM a pH 7,4. El extracto sin procesar obtenido de ese modo se somete a precipitación en una solución acuosa de sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ a un 40 % (m/v). El sobrenadante se somete a diálisis contra un tampón fosfato 20 mM a pH 7, a través de la membrana de límite de exclusión de 3,5 kDa.

20 Se obtiene un extracto de proteínas que contiene principalmente Ara h 1, a que se añade un 2 % en volumen de polivinilpirrolidona (PVPP).

25 La proteína Ara h 1 se purifica a continuación por medio de una columna de Sepharose a la que se injerta concanavalina A. Esta lectina permite la fijación de los motivos glucídicos, estos mismos motivos encontrándose en la proteína Ara h 1. La fijación se realiza en un 20 mmol.l⁻¹ de tampón Tris, pH 7,4, con adición de 0,5 mol.l⁻¹ de NaCl, 1 mmol.l⁻¹ de MnCl₂ y CaCl₂. La elución se realiza en el mismo tampón, al que se le añaden 200 mmol.l⁻¹ de glucosa.

La concanavalina A residual se encuentra en las fracciones recuperadas. Con el fin de eliminar y aumentar la pureza de Ara h 1, las fracciones se reúnen y se dializan durante 48 h contra el tampón Tris a 20 mmol.l⁻¹ a pH 7,4, con el fin de eliminar en un primer tiempo la glucosa que impide la fijación de la Concanavalina A sobre el dextrano.

30 A continuación, las muestras de ensayo se pasan sobre una columna Sephadex G-25 en circuito cerrado durante 24 h a 4 °C, con un caudal de 0,5 ml/min. La concanavalina A se fija sobre los motivos de dextrano, y el eluato contiene exclusivamente Ara h 1.

35 La identidad de esta proteína y su estado de pureza se verifican por SDS-PAGE y caracterización de las fracciones peptídicas obtenidas después de hidrólisis trípica por espectrometría de masas por medio de un espectrómetro de tipo MALDI-TOF.

2/ Purificación de la proteína Ara h 2

40 Los granos de cacahuete crudos se dispersan en tampón Tris 20 mM a pH 7,4, al que se le añade cloruro sódico (NaCl) 150 mM. El extracto sin procesar obtenido de ese modo se somete a una deslipidación con cloroformo, a continuación un extracto sin procesar deslipidado de ese modo se somete a diálisis contra un tampón Tris 20 mM a pH 8, a través de una membrana de límite de exclusión de 3,5 kDa.

Se obtiene un extracto de proteínas que contiene principalmente Ara h 2.

La proteína Ara h 2 se purifica a continuación a partir de este extracto en una columna HiTrap® Q FF (Amersham) de 5 ml, columna aniónica que permite separar las proteínas según su carga, a un pH ligeramente básico.

45 La fijación se realiza por interacción iónica, y la elución mediante un gradiente creciente de NaCl. La proteína Ara h 2 se eluye a una concentración de NaCl de 240 mmol.l⁻¹. Las fracciones recuperadas en la salida de la columna se dializan a continuación contra un tampón Tris de 20 mmol.l⁻¹, pH 7,4.

La identidad de la proteína Ara h 2 y su estado de pureza se verifican por SDS-PAGE y la caracterización de las fracciones peptídicas obtenidas después de la hidrólisis trípica por espectrometría de masas por medio de un espectrómetro de tipo MALDI-TOF.

50

3/ Purificación de la proteína Ara h 3

Los granos de cacahuete crudos se deslpidan con éter de petróleo en un extractor de Soxhlet, a continuación se dispersan en un tampón Tris 20 mM a pH 8.

Se obtiene un extracto de proteínas que contiene principalmente Ara h 3.

- 5 La proteína Ara h 3 se purifica a continuación a partir de este extracto en dos etapas, sobre dos columnas distintas.

La primera columna es la que se al escrito para la purificación de Ara h 2 mencionada anteriormente, es decir, una columna aniónica HiTrap® Q FF de 5 ml. Las condiciones usadas son las mismas que para la purificación de Ara h 2 que se ha mencionado anteriormente, aislada de modo que la elución de Ara h 3 se produce a una concentración de NaCl de 400 mmol.l⁻¹.

- 10 A continuación de este pasaje sobre la primera columna, y después de verificación mediante separación de las proteínas en SDS-PAGE, las fracciones que contienen Ara h 3 se reúnen y se dializan contra un tampón Fosfato De 50 mmol.l⁻¹ a pH 7,0 durante 48 h a 4 °C.

- 15 La separación final de Ara h 3 de las otras proteínas eluidas a 400 mmol.l⁻¹ NaCl sobre HiTrap® Q FF 5 ml se realiza mediante cromatografía en una columna HiTrap® Phenyl HP 5 ml (Amersham), cromatografía denominada « hidrófoba ». Para la fijación y la elución de las proteínas en este tipo de columna, se juega con la hidrofobia de las proteínas, afectada por la concentración más o menos importante de sales caotrópicas ((NH₄)₂SO₄ por ejemplo). Para esto, después de la diálisis, se añade, a la muestra de ensayo, una solución de (NH₄)₂SO₄ de 2,5 mol.l⁻¹ con el fin de obtener una concentración final de (NH₄)₂SO₄ de 1 mol.l⁻¹. La muestra de ensayo se fija a continuación en la columna HiTrap® Phenyl HP, y después del lavado, la elución se realiza con un gradiente decreciente de sal
- 20 (NH₄)₂SO₄ en tampón Fosfato 50 mM a pH 7,0.

Las proteínas contenidas en las fracciones recuperadas se especifican a continuación con ácido tricloroacético y se paran sobre gel SDS-PAGE con el fin de verificar su pureza.

- 25 La identidad de la proteína Ara h 3 y su estado de pureza se verifican por SDS-PAGE y la caracterización de las fracciones peptídicas obtenidas después de la hidrólisis trípica por espectrometría de masas por medio de un espectrómetro de tipo MALDI-TOF.

4/ Inmunización de conejos

- 30 Para cada una de las tres proteínas alergénicas purificadas, la producción de antígenos policlonales se realiza mediante la inmunización de los conejos de Nueva Zelanda. El programa de inmunización se extiende durante 63 días, con 4 inyecciones de 150 a 300 µg de proteínas purificadas extraídas en adyuvante completo de Freund. Se realizan tres tomas de muestras con el fin de seguir la producción de los anticuerpos deseados: a J0 para la verificación de la no reactividad del suero pre-inmunización, a J49 y a J63 para el seguimiento de la respuesta inmunitaria y la elección de la exanguinación total o no de los conejos.

Después de decidir la exanguinación total de los conejos, éstos se sacrifican en un periodo que no supera 40 días después del programa de inmunización de 63 días.

- 35 La especificidad de la sensibilidad de los sueros obtenidos, para la proteína alergénica asociada, se verifica mediante análisis de transferencia de Western, contra un extracto total de cacahuete.

EJEMPLO C - Tratamiento del homogenado del Ejemplo A con microorganismos

El homogenado obtenido en el Ejemplo A se somete a una fermentación respectivamente para cada uno de los siguientes microorganismos probióticos: *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, *Bacillus subtilis*.

- 40 Al final de esta fermentación, las contenidas en el homogenado obtenido de ese modo se extraen, se dosifican y se separan por SDS-PAGE. A continuación se analizan mediante transferencia de Western y ensayo ELISA (para el inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), con el fin de evaluar su grado de alergenicidad.

1/ Material y Métodos

Cultivo de los microorganismos

- 45 *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oligosporus* se cultivan en un medio PDA (para el inglés Potato Dextrose Agar) (para un litro: 4 g de infusión de Patata; 20 g de Dextrosa, 15 g de Agar - esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121 °C/1 bar (0,1 MPa)) en placa de Petri a 37 °C, en una atmósfera húmeda (95 % de humedad relativa) durante 7 días.

- 50 *Bacillus subtilis* se pone en cultivo en un medio CASO (Caseína SOja Trípica) (para un litro: 17,0 g/l de peptona de caseína; 3,0 g/l de peptona de harina de soja; 2,5 g/l de D(+)- glucosa; 5,0 g/l de cloruro sódico; 2,5 g/l de fosfato

dipotásico - esterilizado en autoclave durante 15 minutos a 121 °C/1 bar (0,1 MPa) a 37 °C durante 12 horas.

Puesta en fermentación

Se tratan 10 ml de homogenado, en un frasco Erlenmeyer de 100 ml.

5 Para *Aspergillus oryzae* y *Rhizopus oligosporus*, el pH del homogenado se ajusta a 4,5 con ácido acético. Las esporas cultivadas en placa de Petri se cosechan con la ayuda de agua estéril a la que se añaden varias botas de Tween 20. Después del desprendimiento de las esporas del medio de cultivo con la ayuda de una rasqueta de vidrio, la suspensión se filtra en Miracloth con el fin de no conservar más que las esporas y separarlas del micelio. La suspensión se somete a una agitación vorticial y se hace el recuento con el microscopio gracias a una celda de recuento (celda de Malassez). Las esporas se añaden al homogenado, a razón de $1 \cdot 10^6$ esporas/ml, a continuación el medio resultante se somete a calentamiento a una temperatura de 100 °C durante 10 minutos, a continuación se deja enfriar hasta la temperatura ambiente. El cultivo se pone a fermentar en un sistema aireado hasta la temperatura ambiente. El cultivo se pone a fermentar en un sistema aireado con una agitación orbital (a la velocidad de 50 vueltas/minuto), a una temperatura de 37 °C, durante 72 horas.

15 Las bacterias *Bacillus subtilis* se ponen en cultivo en los medios de cultivo correspondientes hasta obtener una densidad óptica de 0,5 a 600 nm (12 horas a 37 °C). El homogenado se calienta a 100 °C durante 10 minutos y a continuación se enfría a temperatura ambiente. Además se añade maltosa al 2 % (m/v). Las bacterias se inoculan en el homogenado a una concentración de un 50 % (v/v). A continuación el cultivo se pone a fermentar sin agitación, a una temperatura de 37 °C, durante 72 horas.

Extracción de las proteínas después de fermentación del homogenado

20 Después de un tiempo de fermentación dado, 1,5 ml de la fracción de fermentado obtenidos se colocan en un tubo Eppendorf de 2 ml, y se centrifuga a 16 100 x g durante 10 minutos a 4 °C. La capa lipídica superior se elimina y el sobrenadante se extrae y se almacena a -20 °C hasta el análisis. En lo sucesivo se hará referencia al mismo con el término « Sobrenadante ».

25 El sedimento se vuelve a suspender en 1 ml de tampón Tris 20 mM, pH 8,5 y la solución se somete a agitación durante 1 h a temperatura ambiente en una rueda de agitación, a razón de 20 revoluciones por minuto. La solución se centrifuga a continuación a 16 100 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se extrae y se almacena a -20 °C hasta el análisis. En lo sucesivo se hará referencia al mismo con la expresión « Fracción soluble ».

30 El sedimento entonces se vuelve a suspender en 1 ml de un tampón de desnaturalización (500 µl de Tris 1,25 M, pH 6,5; 500 µl de glicerol; 500 µl de SDS al 20 %; 25 µl de ditiotretíol 1 M; 3 475 µl de H₂O) con el fin de solubilizar las proteínas que se hubieran podido agregar durante una etapa cualquiera de tratamiento anterior. La solución se calienta durante 5 minutos a 100 °C, y se centrifuga a 16 100 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se extrae y se almacena a -20 °C hasta el análisis. En lo sucesivo se hará referencia al mismo con la expresión « Fracción insoluble ».

El cacahuete crudo no tratado se somete a las mismas etapas de extracción de las proteínas.

35 Dosificación de las proteínas

Las diferentes fracciones extraídas (Sobrenadante, Fracción soluble y Fracción insoluble) se someten a un análisis cuantitativo de proteínas.

40 El Sobrenadante y la Fracción soluble se diluyen a la 10^a en agua ultra-pura. La Fracción insoluble se diluye a la 10^a en una solución de yodoacetamida 50 mM y se calienta a 37 °C durante 15 minutos (lo que permite oxidar el ditiotretíol y no interferir con los reactivos de la dosificación de BCA). El análisis cuantitativo de las proteínas se realiza con la ayuda del kit BCA de Pierce, en una microplaca de fondo plano de 96 pocillos. La gama patrón es una solución de BSA que varía de 0 mg/ml a 2 mg/ml.

45 Después de la incubación de la solución proteica (25 µl después de dilución) y del reactivo de Pierce (200 µl) durante 30 minutos a 37 °C, se hace la lectura de la absorbancia por medio de un lector espectrofotométrico a una longitud de onda de 562 nm.

Las concentraciones de proteínas para las diferentes cárceles obtenidas se calculan a partir de la gama patrón.

Separación de las proteínas sobre gel

Las proteínas extraídas previamente se separan sobre geles de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización. Los geles se constituyen según las composiciones indicadas en el Ejemplo A que se ha mencionado anteriormente.

50 Las soluciones proteicas se depositan a concentraciones iguales (20 µg por pocillo) y las diluciones se calculan a partir de la dosificación al BCA. Las diluciones se llevan a un volumen de 20 µl, con agua como diluyente. Para las fracciones de Sobrenadante y Fracción soluble, a estos 20 µl se le añaden 4 µl de una solución de tampón de carga

(SDS al 2 %; Tris 0,125 M; glicerol al 10 %; β -mercaptoetanol al 5 %, varios cristales de azul de bromofenol) y se calientan durante 5 minutos a 100 °C antes de su deposición sobre Argel. Para las Fracciones insolubles, a estos 20 μ l se le añaden 4 μ l de una solución (Tris 0,125 M; glicerol al 10 %, varios cristales de azul de bromofenol) y se depositan directamente sobre el gel.

- 5 Las proteínas separadas sobre geles a continuación se colorean según el protocolo que se ha indicado anteriormente en el Ejemplo A.

Transferencia de Western de las fracciones proteicas después de fermentación

10 Para todas las fracciones (Sobrenadante, Fracción soluble y Fracción insoluble), después de la migración de las proteínas sobre gel de electroforesis SDS-PAGE como se ha indicado anteriormente, el gel no se colorea, y las proteínas se electrotransfieren desde este gel sobre una membrana de nitrocelulosa en modo semi-seco, en un tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanol al 20 % (v/v)) a 20 voltios durante 20 minutos (TransBlot® Turbo®, Biorad®). A continuación la membrana se colorea en una solución que contiene un 0,2 % de rojo Ponceau con el fin de verificar la eficacia de la transferencia. Después de la decoloración en tampón fosfato salino (PBS) 1x (para 1 litro: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 , 0,24 g de KH_2PO_4 , pH 7,4). Los sitios de fijación potenciales no utilizados en la membrana se saturan con una solución de tampón PBS al que se le añade un 5 % (m/v) de leche desnatada en polvo, durante una noche a 4 °C.

20 A continuación la membrana se expone a un anticuerpo primario específico de la proteína de interés, obtenido en el Ejemplo B: el anticuerpo primario (combinación de suero de conejo: Anti-Ara h 1 diluido a 1:40 000, Anti-Ara h 2 diluido a 1:5 000, Anti-Ara h 3 diluido a 1:10 000, diluciones en el tampón de saturación) se deposita en la membrana durante 2 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente. La membrana se lava a continuación 3 veces durante 10 minutos en el tampón de saturación con agitación (PBS, leche desnatada al 5 % (m/v), Tween 20 al 0,1 % (v/v)) a continuación se incuba durante 1 hora con un anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo) acoplado a la peroxidasa de rábano picante (diluido a 1:2000 en la solución de saturación).

25 Después de 2 lavados en PBS, Tween 20 al 0,1 %, y dos lavados en PBS solo, las membranas se incuban con un sustrato generando una reacción quimioluminiscente ECL Plus® (Amersham) durante 1 minuto, y la señal quimioluminiscente obtenida se registra con una cámara.

Ensayo de ELISA

30 El ensayo de ELISA permite cuantificar los alérgenos residuales después de la fermentación por los microorganismos, en cada una de las fracciones, Sobrenadante, Fracción Soluble y Fracción insoluble. Este ensayo se realiza por triplicado.

35 Todas las muestras de ensayo se diluyen en PBS. Las diluciones de los diferentes extractos (Sobrenadante, Fracción soluble y Fracción insoluble), así como un extracto sin procesar de cacahuete no tratado (control) se depositan sobre una placa de 96 pocillos, a razón de 50 μ l por pocillo, y a diferentes concentraciones comprendidas entre 0 y 100 ng/ μ l para la detección por el anticuerpo anti-Ara h 1, 0 y 250 ng/ μ l para anti-Ara h 2 y anti-Ara h 3 en lo que respecta a las fracciones de Sobrenadante y Fracción soluble, y entre 0 y 600 ng/ μ l para la Fracción insoluble, sea cual sea el anticuerpo usado para la detección.

40 Después de esta primera deposición, la placa se pone a incubar a 4 °C durante una noche. Después de la incubación, la placa se lava tres veces (200 μ l/pocillo) con PBS. Los pocillos se ponen a saturar a continuación con una solución de PBS, BSA al 1 % (w/v) y Tween al 0,1 % (v/v) (100 μ l por pocillo), durante una hora a temperatura ambiente. Las placas se vuelcan y los pocillos se vacían, y los diferentes sueros se incuban entonces (anti-Ara h 1 diluido a 1:10 000, anti-Ara h 2 diluido a 1:5 000, anti-Ara h 3 diluido a 1:10 000 en PBS/Tween/BSA) durante 2 h a temperatura ambiente, con agitación (50 μ l/pocillo). Las placas se vuelcan enseguida y se lavan 3 veces con una solución de PBS/Tween/BSA (200 μ l/pocillo).

45 El anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo acoplado a la fosfatasa alcalina) se añade a continuación, a razón de 50 μ l por pocillo después de dilución a 1:2 000 en PBS/Tween/BSA, y la placa se pone a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Los pocillos se aclaran a continuación tres veces con PBS/Tween/BSA (200 μ l por pocillo). El sustrato añadido es fosfato de 4-nitrofenilo (pNPP, Sigma), a razón de 100 μ l por pocillo. La placa se pone a incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad con agitación. A continuación se hace una lectura de la absorbancia a 450 nm en un espectrómetro para microplacas.

50 2/ Resultados

2.1/ Fermentación por *Rhizopus oligosporus*

55 Después de 72 horas de fermentación por *Rhizopus oligosporus*, y extracción proteica, siguiendo el protocolo que se ha indicado anteriormente, las proteínas de cada fracción obtenida (Sobrenadante, Fracción soluble y Fracción insoluble) se separan por electroforesis SDS-PAGE. El control usado es un extracto proteico de granos de cacahuete crudos.

El gel obtenido después de coloración se muestra en la figura 5.

5 Ahí se observa que para todas las fracciones proteicas obtenidas después de fermentación del homogenado (Pistas 3 a 5), con respecto al extracto sin procesar de granos de cacahuete no tratados (Pista 2), las bandas que corresponden a los alérgenos principales del cacahuete (aproximadamente 63 kDa para Ara h, aproximadamente 42 y 45 kDa para Ara h 3 y aproximadamente 16 y 17 kDa para Ara h 2) han desaparecido. Estas proteínas ya no están presentes en el fermentado obtenido.

10 El resultado del análisis por transferencia de Western de estas mismas fracciones se muestra en la figura 6. Ahí no se observan, para todos los extractos obtenidos después de tratamiento por fermentación (Pistas 2 a 4), ninguna banda de control del enlace de proteínas a uno cualquiera de los tres anticuerpos anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 o anti-Ara h 3.

Los resultados obtenidos por análisis cuantitativo de ELISA, para cada uno de los anticuerpos anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 o anti-Ara h 3, después de respectivamente 24, 48 y 72 horas de fermentación, se muestran en la Tabla 1 que sigue a continuación.

	Tiempo de fermentación	Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
Sobrenadante	No tratado	302,7		337		365	
	24 h	55	-82 %	94	-72 %	79	-78 %
	48 h	17	-94 %	58	-83 %	46	-87 %
	72 h	10	-97 %	14	-96 %	11	-97 %
Fracción soluble	No tratado	602,67		337		365	
	24 h	90	-85 %	85	-75 %	92	-75 %
	48 h	48	-92 %	48	-86 %	64	-82 %
	72 h	18	-97 %	13	-96 %	16	-96 %
Fracción insoluble	No tratado	121,33		190		183,33	
	24 h	78	-36 %	74	-61 %	92	-50 %
	48 h	34	-72 %	42	-78 %	36	-80 %
	72 h	5	-96 %	9	-95 %	8	-96 %

15 Tabla 1 - Contenido de Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 de los extractos proteicos después de fermentación del homogenado del Ejemplo A por *Rhizopus oligosporus*, determinado por ensayo ELISA

en el que A representa absorbancia a 450 nm.

20 Con respecto al extracto proteico obtenido a partir de granos de cacahuete no tratados, se observa, después de 24 horas de fermentación, una disminución significativa del contenido de proteínas alérgicas principales, Ara h 1, Ara h 2, y Ara h 3. Para todas las fracciones de extracción, después de 72 h de fermentación con esta disminución es superior o igual a un 95 % con respecto a los granos de cacahuete no tratados.

25 El conjunto de los resultados que se ha mencionado anteriormente muestra claramente que la fracción de fermentado obtenida después de la trituración de granos de cacahuete crudos, homogeneización a presión ultra elevada y fermentación por *Rhizopus oligosporus*, según un modo de realización particular del método según la invención, presenta un grado de alérgenicidad fuertemente reducido con respecto al cacahuete crudo no tratado de partida. Las principales proteínas alérgicas del cacahuete, Ara h 1, Ara h 2, y Ara h 3, se extrajeron de forma eficaz de la matriz sólida inicial mediante la homogeneización a presión ultra elevada, y fueron degradadas de

manera eficaz por el microorganismo. Después de 72 horas de fermentación, la alergenicidad de la matriz inicial se redujo en al menos un 95 %.

2.2/ Fermentación por *Aspergillus oryzae*

5 Para este microorganismo, se realizaron ensayos, aplicando los protocolos experimentales que se han mencionado anteriormente, por una parte a partir de granos de cacahuete crudos, y por otra parte a partir de granos de cacahuete tostados. El protocolo que se describe en el Ejemplo A se aplicó del mismo modo en estos últimos, con el fin de obtener un homogenado denominado de cacahuete tostado.

Los granos de cacahuete tostados se obtuvieron según las enseñanzas del documento FR-A-2 713 447.

10 Después de 72 horas de fermentación por *Aspergillus oryzae*, y extracción proteica, siguiendo el protocolo que se ha indicado anteriormente, las proteínas de cada fracción obtenida (Sobrenadante, Fracción soluble y Fracción insoluble) se separan por electroforesis SDS-PAGE. El control usado es un extracto proteico de granos de cacahuete crudos.

El gel obtenido después de coloración se muestra en la figura 7.

15 Se observa que con respecto al extracto sin procesar de granos de cacahuete no tratados (Pista 2), para todas las fracciones proteicas obtenidas después de la fermentación del homogenado, tanto si este último hubiera obtenido a partir de granos de cacahuete crudos (Pistas 3 a 5) o tostados (Pistas 6 a 8), las bandas que corresponden a los alérgenos principales del cacahuete (aproximadamente 63 kDa para Ara h, aproximadamente 42-45 kDa para Ara h 3 y aproximadamente 16 y 17 kDa para Ara h 2) han desaparecido. Estas proteínas ya no están presentes en las fracciones fermentadas obtenidas, o están en cantidad muy baja.

20 El resultado del análisis por transferencia de Western de estas mismas fracciones se muestra en la figura 8. Ahí se observa claramente, para todos los extractos obtenidos después de tratamiento por fermentación de granos de cacahuete crudos (Pistas 3 a 5) como de granos de cacahuete tostados (Pistas 6 a 8), que una cantidad claramente menor de proteínas interactúan con los anticuerpos anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 o anti-Ara h 3, con respecto al extracto obtenido a partir de granos de cacahuete crudos no tratados (Pista 2).

25 Los resultados obtenidos por análisis cuantitativo de ELISA, para cada uno de los anticuerpos anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 o anti-Ara h 3, después de 72 horas de fermentación, se muestran en la Tabla 2 que sigue a continuación.

		Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
Sobrenadante	Crudos no tratados	450		493		372	
	Crudos tratados	26	-94 %	24	-95 %	28	-92 %
	Tostados no tratados	181		128		134	
	Tostados tratados	26	-86 %	23	-82 %	21	-84 %
Fracción soluble	Crudos no tratados	450		493		372	
	Crudos tratados	12	-97 %	21	-96 %	16	-96 %
	Tostados no tratados	181		128		134	
	Tostados tratados	30	-83 %	18	-97 %	27	-80 %

		Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
Fracción insoluble	Crudos no tratados	539		273		280	
	Crudos tratados	47	-91 %	31	-89 %	24	-91 %
	Tostados no tratados	301		293		175	
	Tostados tratados	67	-78 %	65	-78 %	46	-74 %

Tabla 2 - Contenido de Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 de los extractos proteicos después de fermentación del homogenado del Ejemplo A (granos crudos) y de un homogenado obtenido con un protocolo similar a partir de granos de cacahuete tostados, por *Aspergillus oryzae*, determinado por ensayo ELISA

5 en el que A representa absorbancia a 450 nm.

Con respecto al extracto proteico obtenido a partir de granos de cacahuete no tratados, se observa, después de 72 h de fermentación por *Aspergillus oryzae*, una disminución muy significativa del contenido de proteínas alergénicas principales Ara h 1, Ara h 2, y Ara h 3 en los extractos proteicos obtenidos así como a partir de granos de cacahuete crudos como de granos de cacahuete tratados.

10 Estos resultados demuestran que las fracciones fermentadas obtenidas después de trituración de granos de cacahuete crudos o tostados, homogeneización a presión ultra elevada y fermentación por *Aspergillus oryzae*, según un modo de realización particular del método según la invención, presentan un grado de alergenicidad fuertemente reducido con respecto al cacahuete crudo no tratado. Las principales proteínas alergénicas del cacahuete, Ara h 1, Ara h 2, y Ara h 3, se extrajeron de forma eficaz de la matriz sólida inicial mediante la homogeneización a presión
15 ultra elevada, y fueron degradadas de manera eficaz por el microorganismo. En particular, para los granos crudos, después de 72 horas de fermentación, la alergenicidad de la matriz inicial se redujo en al menos un 90 %.

2.3/ Fermentación por *Bacillus subtilis*

Después de 72 horas de fermentación por *Bacillus subtilis*, y extracción proteica, siguiendo el protocolo que se ha indicado anteriormente, las proteínas de las dos fracciones obtenidas (Fracción soluble y Fracción insoluble) se separan por electroforesis SDS-PAGE. El control usado es un extracto proteico de granos de cacahuete crudos.
20

El gel obtenido después de coloración se muestra en la figura 9.

Ahí se observa que para las fracciones proteicas obtenidas después de la fermentación del homogenado (Pistas 2 a 4), con respecto al extracto sin procesar de granos de cacahuete no tratados (Pista 1), las bandas que corresponden a los alérgenos principales del cacahuete (aproximadamente 63 kDa para Ara h, aproximadamente 42-45 kDa para Ara h 3 y aproximadamente 16 y 17 kDa para Ara h 2) han desaparecido.
25

El resultado del análisis por transferencia de Western de estas mismas fracciones se muestra en la figura 10. Ahí no se observa, para los extractos obtenidos después de tratamiento por fermentación (Pistas 2 a 4), ninguna banda de control de la unión de proteínas a uno cualquiera de los tres anticuerpos anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 o anti-Ara h 3.

Los resultados obtenidos por análisis cuantitativo de ELISA, para cada uno de los anticuerpos anti-Ara h 1, anti-Ara h 2 y anti-Ara h 3, después de 72 horas de fermentación, se muestran en la Tabla 3 que sigue a continuación.
30

	Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
No tratado	456		351		382	
Sobrenadante Tratado	23	-95 %	18	-95 %	17	-96 %

	Ara h 1 A	% Ara h 1	Ara h 2 A	% Ara h 2	Ara h 3 A	% Ara h 3
Fracción Tratada soluble	24	-95 %	19	-95 %	21	-95 %
Fracción Tratada insoluble	12	-97 %	15	-96 %	13	-97 %

Tabla 3 - Contenido de Ara h 1, Ara h 2, Ara h 3 de los extractos proteicos después de fermentación del homogenado del Ejemplo A por *Bacillus subtilis*, determinado por ensayo ELISA

en el que A representa absorbancia a 450 nm.

- 5 Con respecto al extracto proteico obtenido a partir de granos de cacahuete no tratados, se observa, después de 72 h de fermentación, una disminución significativa del contenido de proteínas alergénicas principales Ara h 1, Ara h 2, y Ara h 3. Para todas las fracciones de extracción con esta disminución es superior o igual a un 95 %.

10 Los resultados que se han presentado anteriormente muestran claramente que la fracción de fermentado obtenida después de la trituración de granos de cacahuete crudos, homogeneización a presión ultra elevada y fermentación por *Bacillus subtilis*, según un modo de realización particular del método según la invención, presenta un grado de alergenicidad fuertemente reducida con respecto al cacahuete crudo no tratado de partida. Las principales proteínas alergénicas del cacahuete, Ara h 1, Ara h 2, y Ara h 3, se extrajeron de forma eficaz de la matriz sólida inicial mediante la homogeneización a presión ultra elevada, y fueron degradadas de manera eficaz por el microorganismo. Después de 72 horas de fermentación, la alergenicidad de la matriz inicial se redujo en al menos un 95 %.

15 La descripción que se ha mencionado anteriormente ilustra claramente que, por sus diferentes características y sus ventajas, la presente invención consiguió los objetivos que se había fijado. En particular, proporciona un método de preparación de un alimento hipoalérgico, a partir de una matriz alimentaria sólida de alergenicidad elevada, que no es contaminante, y que permite conservar en el alimento las propiedades gustativas, organolépticas y nutricionales de la matriz de partida.

20 **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Chung S.-Y., Champagne ET. (2007) Effects of phytic acid on peanut allergens and allergenic properties of Extracts. J. Agric. Food Chem. 55: 9054-9058

Chung S.-Y., Yang W. (2008) Effects of pulsed UV-light on peanut allergens in extracts and liquid peanut butter. J. Food Chem. 73: C400

- 25 Davis P., Williams, S (1998) Protein modification by thermal processing. Allergy 53: 102-105

Kato T., *et al.* (2000) Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure. J. Agric. Food Chem. 48: 3124-3129

Lecluse W.J. (1979) Homogénéisateurs à haute pression. Informations Chimie 191: 1-8

- 30 Van Boxtel E.L., Koppelman S.J. *et al.* (2008) Détermination of pepsin-susceptible and pepsin-resistant epitopes in native and heat-treated peanut allergen ara h 1. J. Agric. Food Chem. 56: 2223-2230

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de preparación de un alimento con alergenicidad reducida a partir de una matriz alimentaria sólida con partículas de alergenicidad más elevada, que contiene proteínas alergénicas, dicha matriz alimentaria siendo a base de granos de cacahuete sin procesar, frutos secos sin procesar o frutas, caracterizado por que dicho método comprende una etapa de tratamiento de una dispersión de dicha matriz alimentaria sólida en un vehículo acuoso, por homogeneización a alta presión en condiciones hidrodinámicas a una presión comprendida entre 200 y 1000 bares (20 y 100 MPa) y a una temperatura comprendida entre 15 y 90 °C, con el fin de obtener un homogenado constituido por una dispersión de proteínas alergénicas contenidas inicialmente en la matriz en mezcla con partículas sólidas de dicha matriz.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que la matriz alimentaria sólida está constituida por granos de cacahuete sin procesar y/o frutos secos sin procesar.
3. Método según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la matriz alimentaria sólida se somete a una etapa de trituración previamente a la etapa de tratamiento por homogeneización a alta presión.
- 15 4. Método según la reivindicación 3, según el cual la matriz alimentaria sólida se somete a dicha etapa de trituración después de dispersión en el vehículo acuoso.
5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que la dispersión de dicha matriz alimentaria sólida en un vehículo acuoso comprende una proporción en peso de matriz alimentaria sólida por volumen de vehículo acuoso comprendida entre 50/50 y 5/95.
- 20 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la etapa de tratamiento por homogeneización a alta presión va seguida por una etapa de tratamiento del homogenado obtenido con un agente de degradación de las proteínas.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado por que el agente de degradación de las proteínas es un agente proteolítico.
- 25 8. Método según una de las reivindicaciones 6 a 7, caracterizado por que el agente de degradación de las proteínas es un microorganismo.
9. Método según la reivindicación 8, según el cual dicho microorganismo es un microorganismo probiótico.
10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, según el cual dicho microorganismo es una bacteria.
11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, según el cual dicho microorganismo es un hongo.
- 30 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, caracterizado por que al homogenado se le añade azúcar, almidón y/o ácido antes de la fermentación.

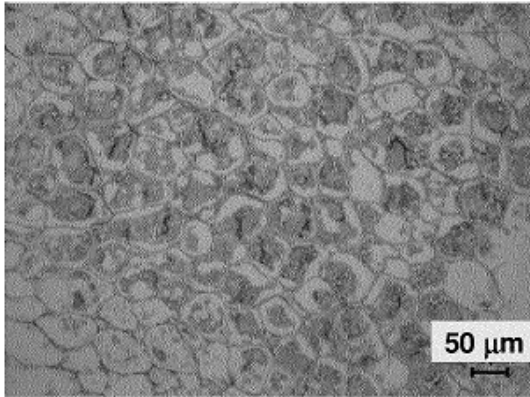


FIG. 1

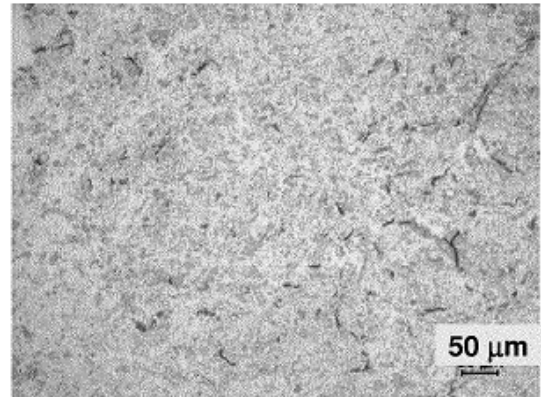


FIG. 2

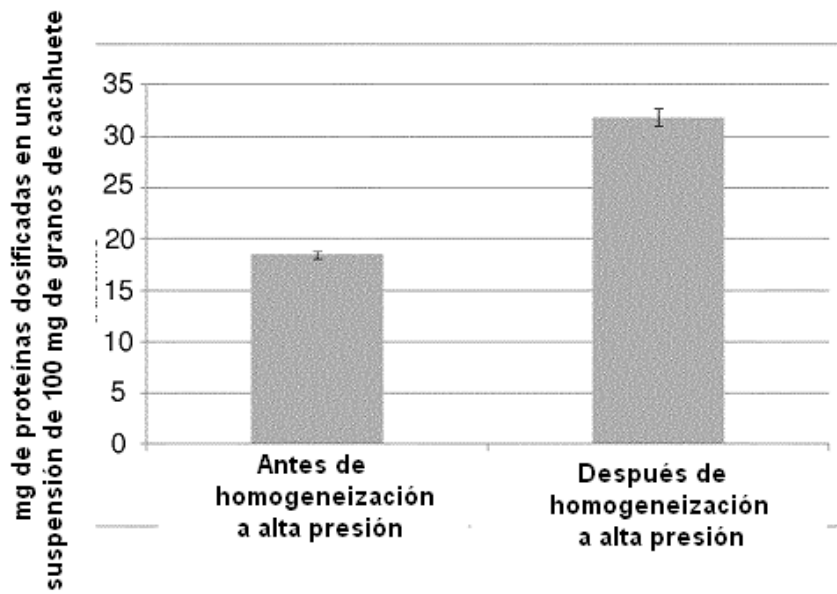


FIG. 3

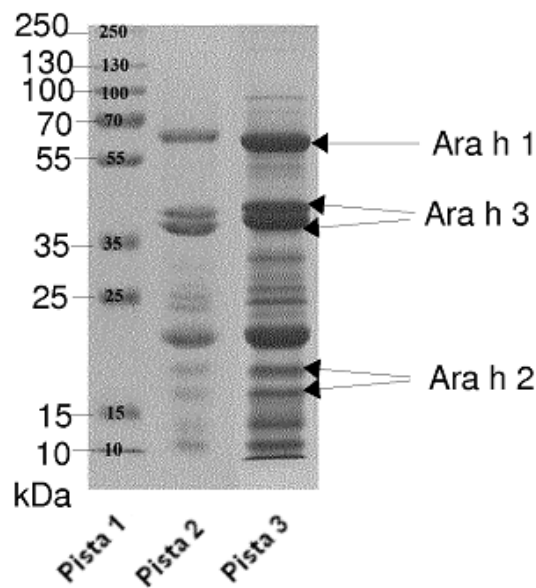


FIG. 4

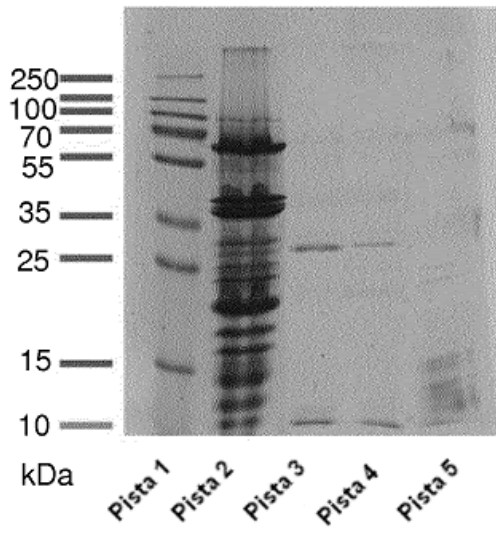


FIG. 5

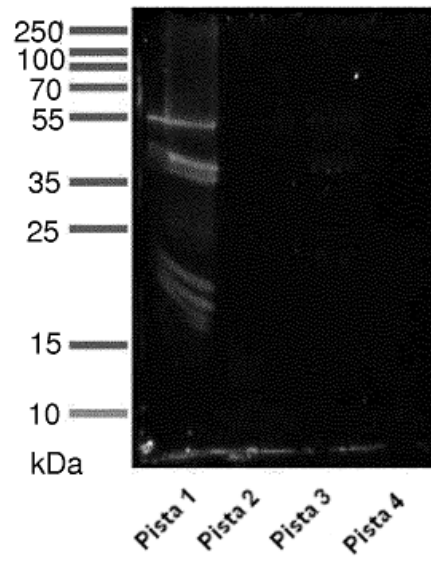


FIG. 6

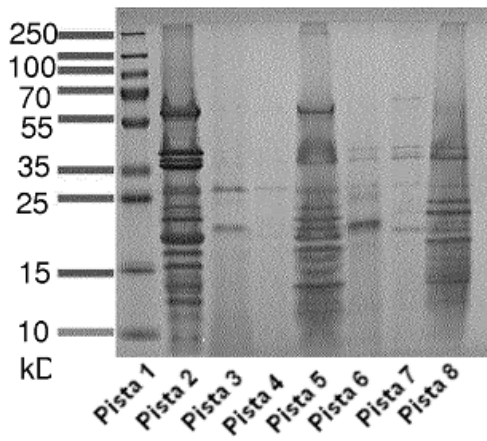


FIG. 7

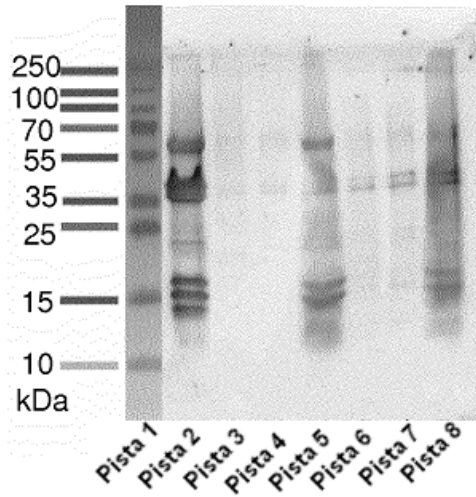


FIG. 8

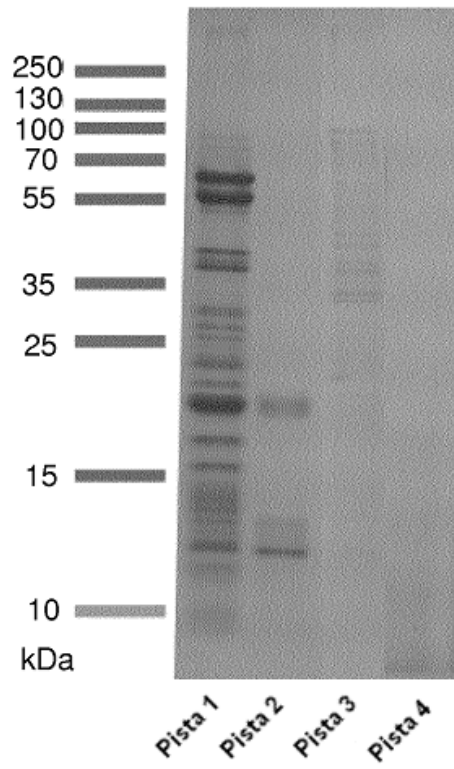


FIG. 9

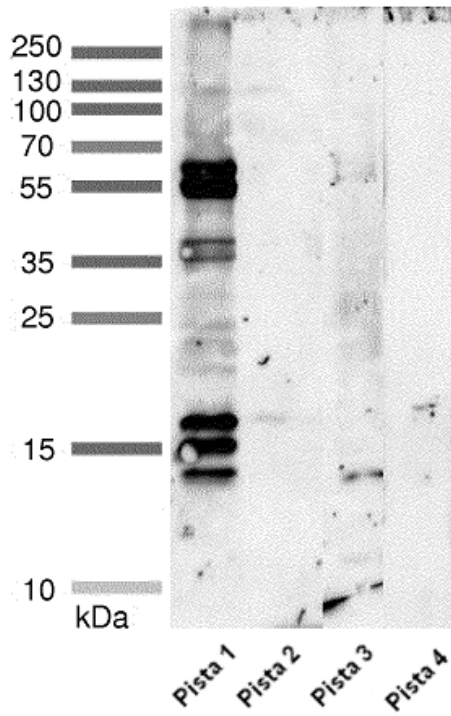


FIG. 10