

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 837 173**

51 Int. Cl.:

**A23J 3/14** (2006.01)  
**A23J 3/26** (2006.01)  
**A23L 5/00** (2006.01)  
**A23L 5/30** (2006.01)  
**A23J 1/14** (2006.01)  
**A23P 30/20** (2006.01)  
**A23P 10/30** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2015** **PCT/EP2015/079903**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2016** **WO16096929**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2015** **E 15831137 (3)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2020** **EP 3232806**

54 Título: **Una solución de proteína de guisantes desnaturalizada y sus usos para formar micropartículas**

30 Prioridad:

**15.12.2014 EP 14198051**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.06.2021**

73 Titular/es:

**ANABIO TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)**  
**11 Herbert Street**  
**2 Dublin, IE**

72 Inventor/es:

**BLEIEL, SINEAD y**  
**KENT, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

### Observaciones:

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

ES 2 837 173 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

Una solución de proteína de guisantes desnaturalizada y sus usos para formar micropartículas

### Campo técnico

- 5 La invención se refiere a una solución de proteína de guisantes desnaturalizada. En particular, la invención se refiere a un método para preparar una solución de proteína de guisante desnaturalizada que es adecuada para formar micropartículas adecuadas para una administración oral a un mamífero y un suministro intacto al intestino delgado del mamífero. La invención se refiere también a métodos para preparar micropartículas y las micropartículas formadas según los métodos de la invención.

### Antecedentes de la invención

- 10 Las proteínas animales (proteínas lácteas, gelatina, caseína) extraídas de productos derivados de animales (leche, colágeno) son ampliamente usadas para la encapsulación de sustancias activas. Estos polímeros naturales presentan ventajas claras: Biocompatibilidad, biodegradabilidad, buenas propiedades anfífilas y funcionales como solubilidad en agua y capacidad de emulsión y formación de espuma. Sin embargo, el coste, la alergenicidad y las limitaciones del mercado representan algunos inconvenientes para las proteínas derivadas de animales.
- 15 Actualmente, la presencia ampliamente extendida de micropartículas basadas en proteínas de animales contrasta con el uso muy limitado de proteínas de vegetales en la industria. Esta tendencia debería invertirse en los años venideros. En aplicaciones alimentarias, las proteínas de vegetales se conoce que son menos alérgicas en comparación con las proteínas derivadas de animales. Por estas razones, durante los años recientes, el desarrollo de nuevas aplicaciones para productos de vegetales con elevado contenido de proteínas se ha convertido en un
- 20 sector de creciente interés para la investigación. Durante la última década, la industria de los ingredientes de proteínas se ha dirigido hacia los vegetales como una alternativa preferida a las fuentes basadas en animales, por ejemplo, en dietas vegetarianas, debido a las preocupaciones crecientes del consumidor sobre la seguridad de los productos derivados de animales.

- 25 Las dos técnicas principales usadas para la microencapsulación de un material activo mediante proteínas vegetales son el secado por aspersión y la coacervación. Ambos procedimientos comparten el aspecto de una "química verde" con proteínas vegetales como fuentes renovables y biodegradables, además las dos técnicas no necesitan el uso de disolventes orgánicos. Se pueden considerar también otros procedimientos como las técnicas de evaporación de disolventes; sin embargo, es necesario la introducción de otros excipientes y polisacáridos para generar una estructura definida.

- 30 El secado por aspersión es un procedimiento continuo que convierte un líquido inicial en un polvo sólido de micropartículas. Es un procedimiento de deshidratación muy común usado para formar una matriz continua que rodea a las sustancias activas. Esta técnica ofrece varias ventajas: es simple, relativamente económica y rápida. El factor importante para la microencapsulación satisfactoria mediante secado por aspersión es una solubilidad elevada del material protector en agua y una baja viscosidad para un elevado contenido de sólidos. Las desventajas de esta
- 35 técnica son la pérdida de una cantidad significativa de productos (debida a la adhesión de las micropartículas a la pared del secador por aspersión) y la posibilidad de degradación de productos sensibles a elevadas temperaturas de secado.

- 40 La microencapsulación mediante coacervación se lleva a cabo mediante la precipitación de materiales formadores de pared alrededor del núcleo activo bajo el efecto de uno de los siguientes factores: cambio de pH o temperatura, adición de no disolvente o compuesto electrolito. La coacervación se produce mediante un método simple o complejo. La coacervación simple implica solamente un soluto coloidal y, por tanto, la formación de una única envoltura polímera. La coacervación compleja se genera mezclando dos polielectrolitos con carga opuesta con el fin de permitir la formación de una corteza alrededor de un núcleo activo. Duce et al. (2004) examinaron el uso de globulina de guisante (punto isoeléctrico en un intervalo de pH de 4,4-4,6) para la microencapsulación de triglicéridos mediante coacervación compleja más la influencia del pH y concentración de polímero sobre el tamaño de las
- 45 microcápsulas. El aumento de la concentración de la combinación de globulina de guisante/goma arábica (50:50) en la preparación inicial dio lugar a un tamaño aumentado de microcápsulas. Por ejemplo, a un pH de 3,5, los diámetros de las microcápsulas variaron de 28 µm a 97 µm con un cambio de concentración de 1 g/l a 10g/l, respectivamente.

Inversamente, Lazko et al. (2004a) observaron una disminución del tamaño del coacervado con un aumento de la concentración de la proteína de guisante. De hecho, el diámetro medio de micropartículas obtenidas disminuyó desde 153 µm hasta 88 µm a medida que la concentración de proteína aumentaba desde 0,5 g/l hasta 5 g/l, respectivamente. Esta discordancia entre los resultados publicados se debió probablemente a diferencias en el procedimiento de coacervación. La coacervación compleja se usó en el caso de las proteínas de guisante y la aglomeración de partículas y la coalescencia aumentaron su tamaño. La presencia de polisacáridos en la preparación inicial puede también tener influencia sobre la aglomeración del coacervado (Klassen and Nickerson, 2012). Por otra parte, se usó una coacervación simple para preparar micropartículas de proteína de guisante. Las concentraciones más elevadas de proteínas con actividad superficial en la emulsión aumentaron la resistencia a la coalescencia de los coacervados.

Klemmer et al (International Journal of Food Science and Technology 2011, 46, 2248-2256) describen una solución de proteína de guisante y su uso para preparar cápsulas que contienen bacterias probióticas. El método de Klemmer implica disolver un aislado de proteína de guisante en un disolvente alcalino, calentar la solución para desnaturalizar la proteína y seguidamente enfriar la proteína desnaturalizada. Seguidamente se añade alginato a la solución de proteína desnaturalizada y la mezcla de biopolímero se somete seguidamente a un calentamiento adicional y etapas de enfriamiento, antes de la adición de la bacteria probiótica y la extrusión de la mezcla a través de una aguja para producir gotitas que son reticuladas en un baño de calcio para formar cápsulas que tienen un diámetro medio de aproximadamente 2 mm. El uso de una solución de guisante/alginato como una matriz para la encapsulación es problemático para una digestión oral ya que la matriz de guisante/alginato no sobrevive al tránsito gástrico, sino que se descompone en el estómago liberando las bacterias probióticas que son destruidas en las condiciones ácidas. Además, la adición de alginato a la solución de proteína de guisante aumenta la viscosidad de la mezcla biopolimérica hasta una medida que es difícil para que sea procesada en forma de microgotitas, lo que significa que las cápsulas resultantes son grandes y no son microgránulos o microcápsulas.

La memoria descriptiva de la patente de EE.UU. nº 2014/314944 describe un método para preparar hidrolizados de proteína de guisante en lugar de las soluciones de proteínas de guisantes desnaturalizadas mientras que Chavan et al. (Food Chemistry, vol. 74, Nº 2, 1 de Agosto de 2001 (2001-08-01), páginas 177-187) describen un método para preparar una solución de proteína de guisante de mar y Diaeldin M. Ragab et al. (Food Chemistry, vol. 84, Nº 2, 1 Febrero de 2004 (2004-02-01), páginas 207-212) describen un método para preparar una solución de proteína de mijo. Stephen Daniels (www.foodnavigator-usa.com, 29 de enero de 2013 (2013-01-29), páginas 1-5) describen una proteína de guisante para añadirla a bebidas y Marina Carbonaro et al (Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 45, Nº 9, 1 de septiembre de 1997 (1997-09-01), páginas 3387-3394) describen una solución que comprende proteína de mijo al 3%. Hao Feng (The Free Online Library, 1 de noviembre de 2015 (2015-11-01), páginas 1-2) describe una combinación de un tratamiento alcalino y ultrasonidos para solubilizar proteína de guisante. Raul Ianchici et al. (Journal on Processing and Energy in Agriculture, 1 de enero de 2011 (2011-01-01), páginas 87-89) describen la influencia de los métodos de extracción y secado de proteínas de guisante sobre su solubilidad.

Es un objeto de la invención proporcionar una solución de proteína de guisante desnaturalizada que es adecuada para ser usada en la formación de micropartículas y un procedimiento para su producción. Es un objeto adicional de la invención proporcionar un procedimiento para formar micropartículas de proteínas de guisantes.

### **Compendio de la invención**

La invención da lugar a una solución de proteína de guisante desnaturalizada que tiene un contenido muy elevado de proteína de guisante soluble (es decir, más de 90% usando el método descrito con posterioridad) y que tiene una viscosidad suficientemente baja para hacer posible que se extruya o pulverice a través de una boquilla (incluidas boquillas de secado por aspersión y ruedas de atomización) durante la formación de microgránulos. El contenido elevado de proteína de guisante desnaturalizada soluble hace posible un procedimiento eficaz en el que se maximiza el uso de sustrato de proteína de guisante. Además, una solución de proteína de guisante desnaturalizada formada según el método de la invención y que tenga una concentración de proteína de guisante de aproximadamente 6-9% (p/v) puede ser eficazmente polimerizada en un ácido para formar micropartículas de tamaño micrónico sin necesidad de biopolímeros adicionales en la matriz y las micropartículas formadas son capaces de permanecer intactas en el tránsito gástrico y ser liberadas en el intestino delgado, específicamente en una liberación ileal.

Según la invención, se proporciona un método para producir una solución de proteína de guisante desnaturalizada que comprende las etapas de:

solubilizar de forma sustancial pero no completa proteína de guisante en un disolvente alcalino a un pH 10 o mayor, o aplicar ultrasonidos a una dispersión o dispersión parcial o disolución parcial de la proteína en un disolvente que tiene un pH de aproximadamente 6-9, para proporcionar una solución de proteína de guisante al 6-9% (p/v);

5 dejar en reposo la solución de proteína de guisante solubilizada durante al menos 15 minutos para solubilizar e hidratar adicionalmente la proteína de guisante;

calentar la solución de proteína de guisante en reposo bajo condiciones suficientes para desnaturalizar con calor al menos un 90% de la proteína de guisante mientras se mantiene la solución en una zona adecuada para una extrusión;

10 enfriar activamente la solución de proteína de guisante desnaturalizada para acelerar el enfriamiento y evitar la gelificación;

en que al menos un 90% en peso de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada está presente en forma de un agregado de proteína de guisante soluble según se determina mediante el método Shake Flask como se describe a continuación bajo el epígrafe "método para determinar la solubilidad de una solución de proteína de guisante".

15 Por lo tanto, la invención proporciona un método para producir micropartículas de proteína de guisante que son esféricas, normalmente tienen una distribución de tamaño homogénea y son capaces de resistir intactas el paso a través del estómago de mamíferos y posteriormente descomponerse en el intestino delgado, específicamente en el íleon. Esto permite que las micropartículas suministren agentes activos sensibles a ácidos al intestino delgado sin deterioro. Además, la forma esférica de las micropartículas y la distribución de tamaños homogénea permite que se produzcan cinéticas de liberación de agentes activos controladas y repetibles. El método para la producción de las micropartículas implica formar gotitas de la solución de proteína de guisante desnaturalizada de la invención y seguidamente la gelificación en frío de las gotitas en un baño ácido. Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que el uso de un baño gelificante ácido que tiene un pH que sea igual que el pH de la proteína de guisante da lugar a micropartículas de forma irregular y que para conseguir micropartículas altamente esféricas (como las mostradas en la Fig. 2) se requiere que el pH del baño gelificante sea menor que el pH de la proteína de guisante.

30 La proteína de guisante es solubilizada antes de dejarla en reposo por medios químicos o físicos, como se define en las reivindicaciones anejas. La solubilización química implica mezclar la proteína de guisante con un álcali, para proporcionar una solución de proteína de guisante alcalina que tiene un pH de 10 o más. La solubilización física implica tratar una dispersión (o dispersión parcial o disolución parcial) de la proteína en un disolvente por medio de ultrasonidos. El disolvente generalmente es un disolvente acuoso, por ejemplo, un tampón de fosfato o un tampón de borato. El disolvente tiene un pH de aproximadamente 6-9. Idealmente, el tampón tiene un pH de aproximadamente 7-8.

35 Normalmente, la proteína de guisantes se mezcla con un disolvente alcalino para proporcionar una solución de proteína de guisante al 6-9% (p/v) que tiene un pH de al menos 7, en una realización al menos 10.

Preferentemente, la proteína de guisante se mezcla con un disolvente alcalino para proporcionar una solución de proteína de guisante que tiene un pH de 7 a 10.

40 Normalmente, la solución de proteína de guisante desnaturalizada y enfriada se clarifica para separar la materia insoluble. Serán evidentes diversos métodos de clarificación para un experto en la técnica. Preferentemente, la solución se clarifica por centrifugación.

Normalmente, la solución de proteína de guisante se deja en reposo durante al menos 30 minutos. Idealmente, la solución de proteína de guisante se deja en reposo durante al menos 40 minutos. En una realización, la solución de proteína de guisante se deja en reposo durante al menos 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 minutos.

45 En un aspecto adicional, la invención proporciona una solución de proteína de guisante desnaturalizada que comprende 1-10% de proteína de guisante desnaturalizada (p/v) en un disolvente, en la que al menos un 90% de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada es soluble.

En una realización, el disolvente es un disolvente alcalino y la solución tiene un pH de al menos 10. Preferentemente, la solución de proteína de guisante desnaturalizada comprende 6-9% de proteína de guisante desnaturalizada (p/v). Idealmente, la solución de proteína de guisante desnaturalizada comprende 6,5-8,5% de proteína de guisante desnaturalizada (p/v). Preferentemente, al menos un 95% de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada es soluble. Preferentemente, la solución de proteína de guisante desnaturalizada tiene una viscosidad que es suficientemente baja para permite que la solución se extruya en forma de microgotitas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para producir micropartículas que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada, comprendiendo el método las etapas de:

- 10 proporcionar una solución de proteína de guisante desnaturalizada según las reivindicaciones 7 o 8, tratar la solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas;

reticular y quelar las microgotitas, en que la etapa de reticulación y la quelación de las microgotitas comprende gelificar inmediatamente las microgotitas en un baño gelificante ácido que tiene un pH que es menor que el pH de la proteína de guisante, para formar micropartículas.

- 15 Adecuadamente, la etapa de tratar la solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas comprende la etapa de extruir la solución a través de un montaje de boquillas para formar microgotitas. En una realización, el agente activo se añade a la solución de la proteína de guisante desnaturalizada antes de la etapa de formación de microgotitas y, opcionalmente después de la etapa de calentamiento, en que el montaje de boquillas comprende normalmente una única boquilla y en que las micropartículas son microgránulos que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada continua con el agente activo distribuido por toda la matriz de proteína de guisante desnaturalizada. Preferentemente, la boquilla es calentada.

- 20 En otra realización, el montaje de boquillas comprende una boquilla externa dispuesta concéntricamente alrededor de una boquilla interna, de forma que la solución de proteína de guisante desnaturalizada es extruida a través de la boquilla externa y una solución de agente activo que comprende agente activo es extruida a través de la boquilla interna y de forma que las micropartículas son microcápsulas que tienen una corteza de proteína de guisante desnaturalizada y un núcleo que comprende un agente activo.

Normalmente, el montaje de boquillas comprende un sistema de voltaje electrostático configurado para aplicar un potencial eléctrico entre la boquilla y un electrodo dispuesto debajo de la boquilla. La boquilla puede representar también una boquilla típica que se encuentra en un secador por aspersión.

- 30 En una realización preferida, la invención proporciona un método para producir micropartículas, normalmente micropartículas esféricas e idealmente micropartículas esféricas que tienen una distribución de tamaños homogénea, que tiene una matriz de proteína de guisante desnaturalizada, comprendiendo el método las etapas de:

producir una solución de proteína de guisante desnaturalizada al 6-9% según la invención o formada según el método de la invención;

- 35 extruir la solución a través del montaje de boquillas para formar microgotitas;

inmediatamente gelificar las microgotitas en un baño gelificante ácido que tiene un pH que es menor que el pH de la proteína de guisante para formar microgránulos esféricos.

- 40 La descripción se refiere también a una microcápsula que tiene una corteza y un núcleo que comprende proteína nativa. En una realización, la proteína nativa es proteína vegetal nativa. En una realización, la proteína nativa es proteína de guisante. En una realización, la microcápsula es resistente a los jugos gástricos (puede pasar intacta a través del estómago de mamíferos (especialmente seres humanos)). En una realización, la microcápsula es capaz de liberar el núcleo en el intestino delgado del mamífero (especialmente el ser humano), preferentemente el íleon, idealmente el íleon próximo. En una realización, la corteza es proteína desnaturalizada. En una realización, la corteza es proteína de guisante desnaturalizada. En una realización, la microcápsula está revestida con quitosano o gelatina.

La descripción se refiere también a un microgránulo que tiene una matriz continua, formada por un polímero polimerizado y un agente activo dispersado a través de la matriz de polímero polimerizada. En una realización, el microgránulo es resistente a los jugos gástricos. En una realización, el microgránulo es capaz de liberar el agente activo en el intestino delgado del mamífero (especialmente el hombre), preferentemente el íleon, idealmente el íleon próximo. En una realización, el polímero polimerizado es una proteína desnaturalizada. En una realización, la proteína desnaturalizada es proteína de guisante desnaturalizada. En una realización, el microgránulo está revestido con quitosano o gelatina.

La descripción se refiere también a micropartículas formadas según un método de la invención, en una realización, las micropartículas de la presente descripción o formadas según el método de la presente descripción (es decir, microgránulos o microcápsulas) están revestidas con quitosano o gelatina. Esto se puede conseguir sumergiendo las micropartículas en un baño que contiene quitosano o gelatina y dejando las micropartículas sumergidas durante un período de tiempo para que el quitosano o la gelatina en el baño formen un revestimiento sobre las micropartículas. En una realización, un baño de quitosano comprende de 0,5 a 2,0 de quitosano (p/v) en un disolvente de ácido orgánico débil (es decir, ácido acético). En una realización, un baño de gelatina comprende de 0,5 a 5,0% de gelatina (p/v) en un ácido orgánico débil (es decir, ácido acético) o un disolvente acuoso. En una realización, los métodos de la invención incluyen una etapa adicional de revestimiento de las micropartículas en una solución de quitosano o gelatina, opcionalmente mediante inmersión de las micropartículas en un baño de gelatina o quitosano.

#### Breve descripción de las figuras.

Fig. 1: Espectros infrarrojos de microgránulos y capsulas de proteína de guisante.

Fig. 2: Imagen de microscopio óptico de microgránulos de proteína de guisante después de una encapsulación (A) y en presencia de cultivos probióticos encapsulados (B) la barra representa 200 micrómetros.

Fig. 3: Imagen de microscopio confocal de microgránulo de proteína de guisante usando tinción confocal óptica BAC. La fluorescencia verde indica probióticos vivos y la fluorescencia roja indica probióticos muertos. La Figura A ilustra la topografía del microgránulo; B y C ilustran el área superficial grande de la membrana del microgránulo.

Fig. 4: Imagen de microscopio de fuerza atómica de la superficie de una microcápsula (A) y microgránulo (B) de proteína.

Fig. 5: Ilustración de microscopio óptico de suministro gastrointestinal *in vitro* de microgránulos de proteína de guisante. Las imágenes ilustran (A) incubación en el estómago después de 30 minutos a pH 1,6; (B) incubación en el estómago después de 180 minutos a pH 1,6; figura C ilustra digestión de microgránulos después de 5 minutos de incubación intestinal (pH 7,2).

Fig. 6: Resistencia a la tracción de microgránulos de proteína de guisante durante una incubación en estómago *in vitro*.

Fig. 7: visualización de la disolución progresiva de microgránulos de proteína de guisantes durante una incubación gastrointestinal *ex vivo*. Una HPLC de exclusión de tamaños midió la liberación de proteínas/péptidos a partir de microcápsulas (B) después de 30 minutos de incubación intestinal. La curva estándar de patrones de proteínas/péptidos (♦) indicó los pesos moleculares de péptidos típicos que se espera encontrar en muestras intestinales.

Fig. 8: eficacia de encapsulación de una cepa bacteriana en microgránulos aislados de proteína de guisante comercial al 8% (p/v). La suspensión de proteína de guisante representa células libres en presencia de un aislado de proteína de guisante comercial. Los microgránulos de proteína de guisante representan los niveles de células viables detectadas a continuación de una microencapsulación de la suspensión de proteína de guisante y un lavado (en agua). La Figura B ilustra la comparación de CFU/g de mezcla de matriz/bacteriana de preencapsulación (naranja) y posteriores microgránulos bacterianos (gris) con una elevada capacidad celular.

Fig. 9: supervivencia de células bacterianas libres en un producto/prototipo final, células bacterianas encapsuladas con microgránulos de aislado de proteína de guisante comercial al 8% (p/v y células bacterianas libres en una

suspensión aislada de proteína de guisante comercial al 8% (p/v). Las barras grises ilustran la concentración celular en el prototipo/producto final. Cada prototipo fue añadido separadamente a agua mantenida a ~85% y mantenido durante 90 segundos antes de enfriar en hielo. La viabilidad celular se analizó usando el método de recuento de placas.

5 Fig. 10: ilustra la presencia de cápsulas de proteína de guisante *in vivo* en el estómago de candidatos humanos.

Fig. 11: liberación de péptidos y aminoácidos en el yeyuno durante el tránsito gastrointestinal *in vivo* de microcápsulas de proteínas de guisantes.

10 Fig. 12: ilustra la presencia de proteína intacta (línea azul) y liberación de péptido, línea negra, medida mediante HPLC de exclusión de tamaños en el yeyuno y el íleon de candidatos humanos. Las cantidades residuales de péptidos identificadas en los digestos intestinales a  $t = 10$  minutos se representan mediante la referencia roja.

Fig. 13: Microgránulos preparados mediante un método de englobado usando una solución de proteína de guisante desnaturalizada que no estuvo en reposo antes de la etapa de desnaturalización con calor - ADDED.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

15 “Proteína de guisante” se debe entender que significa una fuente de proteína de guisante, por ejemplo, proteína de guisante total. Preferentemente, la proteína de guisante es aislado de proteína de guisante (PPI), concentrado de proteína de guisante (PPC) o una combinación de cualquiera de ellos. En una realización, la proteína de guisante tiene una pureza de al menos 70% (es decir, al menos 90% en peso de la fuente de proteína de guisante es una proteína de guisante). En una realización, la proteína de guisante tiene una pureza de al menos 80%. En una  
20 realización, la proteína de guisante tiene una pureza de al menos 90%. Ejemplos de proteína de guisante que tienen una pureza elevada incluyen materiales con un bajo contenido de cenizas.

25 “Solubilizar parcialmente” significa que la proteína de guisante está sustancialmente pero no completamente solubilizada en un disolvente adecuado. Generalmente, hasta un 60% o un 70% de la proteína de guisante está solubilizada. La solubilización parcial se consigue generalmente por medios químicos (es decir, solubilización en álcali) o por medios físicos (por ejemplo, ultrasonidos). Es necesaria una etapa de mantenimiento en reposo para conseguir una solubilización más completa, por ejemplo, una solubilización de un 90% o más de la proteína de guisante.

30 “Disolvente alcalino” significa una solución acuosa de una base adecuada, por ejemplo, NaOH o KOH. Preferentemente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de base 0,05-0,2 M, más preferentemente 0,05-0,15. Idealmente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de base 0,75-0,125 M. Normalmente, el disolvente alcalino es una solución acuosa de NaOH, por ejemplo, NaOH 0,05-0,2 M. Preferentemente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de NaOH o KOH 0,05-0,2 M, preferentemente NaOH o KOH 0,05-0,15. Idealmente, el disolvente alcalino comprende una solución acuosa de NaOH o KOH 0,075-0,125 M.

35 “pH de al menos 10” significa un pH de más de 10, normalmente un pH de 10-13 o 10-12. Idealmente, el pH de la solución de proteína de guisante es de 10,5 a 11.

40 “Ultrasonidos” significa la aplicación de una energía de sonidos para solubilizar parcialmente e hidratar la proteína de guisante. El procedimiento implica generalmente preparar una dispersión/solución de proteína de guisante y aplicar seguidamente una energía de sonidos, generalmente sonidos de frecuencias ultrasónicas, a la dispersión/solución durante un período de tiempo suficiente para solubilizar e hidratar la proteína de guisante. Los ultrasonidos están disponibles en el comercio en la entidad Qsonica LLC y SinapTec.

45 “Solución de proteína de guisante” significa una composición de proteína de guisante líquida que comprende proteína de guisante soluble y, opcionalmente, proteína de guisante insoluble. Los métodos de la invención proporcionan soluciones de soluciones de guisantes que comprenden niveles elevados de proteínas de guisante soluble, normalmente más de 90% o 95%. Por ejemplo, 95-98% de proteína de guisante soluble). Cuando la proteína de guisante se mezcla con un disolvente alcalino, o se somete a ultrasonidos, la cantidad de guisante

soluble aumentará gradualmente durante la etapa de reposo hasta que se solubilizan niveles elevados de la proteína de guisante, en cuyo momento la solución de proteína de guisante es desnaturalizada con calor. Esto da lugar a una solución de proteína de guisante desnaturalizada que tiene niveles muy elevados de proteína de guisante desnaturalizada presente en la forma de agregados de proteína de guisante desnaturalizada soluble.

5 El término “soluble” o “solubilizado” aplicado a una proteína de guisante (o proteína de guisante desnaturalizada) debe entenderse que indica que la proteína de guisante está presente en forma de un agregado de proteína de guisante soluble. Normalmente, estos términos significan que los agregados solubles no se separarán de la solución tras una centrifugación a 10.000 x g durante 30 minutos a 4° C.

10 “Mantener en reposo la solución de proteína de guisante” significa dejar la solución de proteína de guisante en reposo durante un período de tiempo para permitir que la proteína de guisante se solubilice en el disolvente alcalino. Generalmente, la solución de proteína de guisante se deja en reposo durante al menos 20, 25, 30, 35, 40 o 45 minutos. Normalmente, la solución de proteína de guisante se deja en reposo a temperatura ambiente. Normalmente, la solución de proteína de guisante se deja en reposo durante un período de tiempo hasta que al menos un 90% de la proteína de guisante se haya solubilizado. Antes de estar en reposo, la solución de proteína de guisante tiende a ponerse turbia y opaca y contiene un sedimento, pero después de un período de reposo la turbidez se disipa a medida que aumenta la cantidad de proteína de guisante solubilizada. Como un ejemplo, la etapa de reposo puede aumentar el % de la proteína solubilizada desde 60% hasta 90% o más.

20 “Condiciones suficientes para desnaturalizar con calor la proteína de guisante sin provocar gelificación de la solución de proteína de guisante” significa una temperatura y un tiempo de tratamiento que desnaturalicen al menos un 90%, 95% o 99% de la proteína de guisante presente en la solución mientras se mantiene la solución en una forma adecuada para una extrusión (es decir, capaz de fluir libremente con una viscosidad adecuada). La temperatura y los tiempos empleados se pueden variar dependiendo de la concentración de la solución de proteína de guisante. Así, por ejemplo, cuando se usa una solución de proteína de guisante al 8% (p/v), la solución puede ser tratada a una temperatura de 80-90°C durante 20-30 minutos (o preferentemente, 85° C durante 25 minutos). Sin embargo, se apreciará que se pueden emplear también temperaturas superiores y tiempos más reducidos.

30 “Enfriar rápidamente la solución de proteína de guisante desnaturalizada” significa enfriar activamente la solución para acelerar el enfriamiento en comparación con simplemente permitir que la solución se enfríe a temperatura ambiente, que el solicitante ha descubierto que provoca que la solución gelifique. Se puede conseguir un enfriamiento rápido colocando la solución en un frigorífico a congelador, o sobre hielo triturado, hasta que la temperatura de la solución se haya reducido hasta al menos la temperatura ambiente.

“Al menos un 90% (p/p) de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada es soluble” significa que al menos un 90% en peso de la proteína de guisante total en la solución está en una forma solubilizada. Preferentemente al menos un 95% (p/p) e idealmente de un 95% a 98% de la proteína de guisante está solubilizada. El método para medir la solubilidad es el método del frasco de agitación descrito con posterioridad.

35 “Tratado para separar materia soluble” significa una etapa de separación o clarificación para separar la materia soluble como la proteína de guisante insoluble de la solución de proteína de guisante. En las realizaciones específicas descritas en la presente memoria descriptiva, se emplea la centrifugación (10.000 x g durante 30 minutos a 4° C), pero otros métodos serán evidentes para un experto en la técnica como, por ejemplo, una filtración o similar.

40 “Solución de proteína de guisante desnaturalizada” significa una solución de proteína de guisante en la que al menos un 90%, 95% o 99% de la proteína de guisante total está desnaturalizada. Un método para determinar el % de proteína de guisante desnaturalizada en una solución de proteína de guisante se proporciona con posterioridad.

45 “Tratar una solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas” significa normalmente hacer pasar la solución a través de un orificio pequeño con lo que la solución se descompone en forma de gotitas de tamaño micrónico. Preferentemente, la solución se extruye a través de un orificio. Diversos métodos serán evidentes para un experto en la técnica para generar gotitas, por ejemplo, granulación y pulverización (es decir, secado por aspersión). Un método preferido para producir los microgránulos es una técnica de boquilla de vibración, en la que la suspensión es pulverizada (extruida) a través de una boquilla y se induce la rotura laminar del chorro pulverizado aplicando una frecuencia sinusoidal con una amplitud definida a la pulverización de la boquilla. Ejemplos de

máquinas de boquilla de vibración son dispositivos Encapsulator (Inotech, Suiza) y una máquina producida por la empresa Nisco Engineering AG, o versión a escala equivalente como las producidas por la empresa Brace GmbH. Normalmente, la boquilla de pulverización tiene una abertura entre 50 y 600 micrómetros, preferentemente entre 50 y 200 micrómetros, adecuadamente de 50-200 micrómetros, normalmente de 50-150 micrómetros e idealmente de aproximadamente 80-150 micrómetros. Adecuadamente, la frecuencia de funcionamiento de la boquilla de vibración es de 900 a 3.000 Hz. Generalmente, el potencial electrostático entre la boquilla y el baño de acidificación es de 0,85 a 1,3 V. Adecuadamente, la amplitud es de 4,7 kV a 7 kV. Normalmente, la distancia de caída (desde la boquilla hasta el baño de acidificación) es de menos de 50 cm, preferentemente menos de 40 cm, adecuadamente, entre 20 y 40 cm, preferentemente entre 25 y 35 cm e idealmente de aproximadamente 30 cm. El caudal de suspensión (que pasa a través de la boquilla) es normalmente de 3,0 a 10 ml/min; un caudal ideal depende del tamaño de la boquilla utilizada en el procedimiento.

“Gelificar inmediatamente las gotitas en un baño gelificante ácido para formar microgránulos” significa que las gotitas gelifican instantáneamente tras una inmersión en el baño ácido. Esto es importante ya que asegura que las gotitas tienen una forma esférica y una distribución de tamaños homogénea. De forma preferente y sorprendente, se consigue una gelificación instantánea empleando un baño ácido que tiene un pH menor que el pH de la proteína de guisante, por ejemplo, un pH de 3,8 a 4,2.

“Baño gelificante ácido” significa un baño que tiene un pH por debajo del pH de la proteína de guisante que es capaz de gelificar instantáneamente las gotitas. Normalmente, el baño gelificante ácido tiene un pH de menos de 4,3, por ejemplo, de 3,5 a 4,2, de 3,7 a 4,2 o de 4,0 a 4,2. El baño gelificante ácido se forma generalmente a partir de un ácido orgánico. Idealmente, el ácido es ácido cítrico. Normalmente, el baño gelificante ácido tiene una concentración ácida de 0,1 M a 1,0 M, preferentemente de 0,3 M a 0,7 M y más preferentemente de 0,4 M a 0,6 M. Normalmente, el baño gelificante ácido tiene una concentración de ácido cítrico de 0,1 M a 1,0 M, preferentemente de 0,3 M a 0,7 M y, más preferentemente, de 0,4 M a 0,6 M. Preferentemente, el baño gelificante ácido comprende ácido cítrico de 0,4 a 0,6 M y tiene un pH de menos de 4,3, normalmente de 4,0 a 4,2.

“Micropartículas” se debe entender que significa generalmente partículas esféricas que comprenden un polímero gelificado, por ejemplo, proteína desnaturalizada, por ejemplo, proteína de guisante desnaturalizada y que tienen un diámetro medio de 50 a 500 micrómetros según se determina usando el método de microscopio óptico descrito con posterioridad. Preferentemente, las micropartículas tienen un diámetro medio de 50-200 micrómetros según se determina usando el método del microscopio óptico descrito con posterioridad. Preferentemente, las micropartículas tienen un diámetro medio de 80-200 micrómetros según se determina usando el método del microscopio óptico descrito con posterioridad. Preferentemente, las micropartículas tienen un diámetro medio de 80-150 micrómetros según se determina usando el método del microscopio óptico descrito con posterioridad. Dependiendo del método de fabricación, las micropartículas pueden ser microgránulos o microcápsulas.

“Microgránulos” significa partículas de tamaño micrónico que son generalmente esféricas y tienen una matriz polimerizada continua, por ejemplo, una matriz de proteína desnaturalizada, por ejemplo, una matriz de proteína de guisante desnaturalizada y, opcionalmente, un agente activo dispersado por toda la matriz de proteína de guisante.

“Microcápsulas” significa partículas de tamaño micrónico que son generalmente esféricas y tienen una corteza formada por un polímero gelificado, por ejemplo, una proteína desnaturalizada, por ejemplo, proteína de guisante desnaturalizada y un núcleo dentro de la corteza. El núcleo puede ser un líquido o un sólido, o incluso un gas. En una realización el núcleo comprende una proteína nativa, por ejemplo, proteína de guisante nativa.

“Agente activo” significa cualquier componente adecuado para ser suministrado al intestino delgado o íleon del mamífero, pero normalmente significa un componente que es sensible a una condición externa, por ejemplo, calor, pH, presión tensión química o enzimas. Por tanto, el componente activo puede ser sensible al pH, enzimas (por ejemplo, enzimas, proteasas, presión elevada, cizallamiento elevado y exceso de temperatura durante el almacenamiento. En una realización particularmente preferido de la invención, el componente activo es una célula, normalmente una célula bacteriana e idealmente una célula probiótica. Estas células son sensibles a condiciones de pH bajo, como las que se encuentran en el estómago, y como tales necesitan ser protegidas del pH gástrico y los entornos de sales biliares. Las bacterias probióticas, y también otros tipos de células, son también sensibles a un cizallamiento elevado o una presión elevada, como las que se emplean en métodos convencionales para generar gránulos polímeros de tamaño micrónico. Otros tipos de componentes activos que pueden ser encapsulados en los microgránulos de la invención incluyen micronutrientes, vitaminas, minerales, enzimas, bacterias de entrada, extractos celulares, proteínas y polipéptidos nativos o desnaturalizados) azúcares y derivados de azúcares, ácidos

nucleicos y constructos de ácidos nucleicos, agentes farmacéuticamente activos, colorantes de formación de imágenes y ligandos, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, productos fitoquímicos y similares.

“Solución de agente activo” significa un agente activo contenido en un vehículo líquido adecuado en la forma de una solución, dispersión o suspensión.

- 5 “Montaje de boquillas” significa un aparato que comprende al menos una boquilla que está configurado para extruir la solución de proteína de guisante a través de al menos una boquilla. En una realización, el montaje de boquillas comprende una única boquilla, de forma que se puede extruir una mezcla de agente activo y solución de proteína de guisante, de manera que la boquilla forma gotitas que, cuando se gelifican, forman microgránulos. En otra realización, el montaje de boquillas comprende una boquilla externa dispuesta de forma concéntrica alrededor de una boquilla interna, en el que la solución de proteína de guisante es extruida a través de la boquilla externa y la solución/suspensión/dispersión de agente activo es extruida a través de la boquilla interna para producir gotitas que, cuando gelifica forman microencapsulados con una corteza de proteína de guisante gelificada y un núcleo que contiene agente activo.

- 15 “Curado en el baño gelificante ácido” significa que se permite que los microgránulos permanezcan en el baño gelificante durante un período de tiempo para curar (endurecer) los microgránulos. El período de tiempo varía dependiendo de los microgránulos, pero normalmente se emplea un tiempo de curado de al menos 30 minutos.

#### Ejemplo 1

Formación de solución de proteína de guisante desnaturalizada altamente solubilizada (solubilización en álcali)

- 20 Se prepara solución de proteína de guisante en NaOH 0,1 M hasta una concentración de 8% p/v (Es decir, 8 g/100 ml)

Se asegura que el pH esté en el intervalo de 10,5-11,0

Se coloca la solución en almacenamiento durante 45 minutos a temperatura ambiente hasta que la proteína esté completamente solubilizada.

Se ajusta el pH a 10 usando HCl o NaOH/KOH en la medida necesaria

- 25 Se trata con calor la solución a una temperatura de 85° C y se mantiene la temperatura durante un período de 25 minutos

Después de calentar se enfría inmediatamente en hielo triturado durante 30-45 minutos

Se centrifuga la solución la solución enfriada a 10.000 x g durante 30 minutos a 4 °C

#### Ejemplo 2

- 30 Formación de solución de proteína de guisante desnaturalizada altamente solubilizada (solubilización por ultrasonido)

Dispositivos de ultrasonidos

Dispositivos de ultrasonidos Hielscher 1000hd, actualmente ubicado cerca de la entidad BFE en Teagasc Moorepark.

#### Procedimiento

- 35 • Se hidrata la proteína en H<sub>2</sub>O durante un mínimo de 1 h antes del procedimiento.
- Se ajusta al pH necesario (por ejemplo, 7).

- El volumen óptimo para este sistema es de 200-600 ml de muestra. El frasco para muestras no debe llenarse demasiado para permitir la inserción de la sonda de ultrasonidos.
  - Se coloca el frasco de muestras en hielo antes del procedimiento.
  - En el espacio con el dispositivo de ultrasonidos, girar el dispositivo hacia la esquina derecha del espacio y conectar el enchufe tres orificios negros a la parte posterior del dispositivo.
  - Colocar la muestra en el dispositivo de ultrasonidos y ajustar la altura (se pueden usar libros, cajas de guantes, etc.) de forma que 3/4 partes de la sonda estén en la muestra.
  - Después de asegurarse de que esté instalada una protección acústica, encender el dispositivo usando el interruptor en la parte superior derecha de la máquina.
  - La puerta del dispositivo de ultrasonidos no tiene que ser cerrada para un correcto funcionamiento.
  - La potencia del dispositivo puede ser ajustada usando la rueda colocada en el panel de control (el funcionamiento habitual usa la potencia máxima durante 10 minutos).
  - Se aplican ultrasonidos a la potencia necesaria durante el tiempo necesario.
  - Se retira la muestra, se aconseja registrar la temperatura de la muestra a continuación del procedimiento.
  - El procedimiento puede conducir al desarrollo de fragmentos en la muestra. Se puede usar un dispositivo Ultra Turrax con el fin de romper cualesquiera fragmentos que puedan aparecer si es necesario (particularmente se la muestra va a ser usada para una encapsulación/secado por aspersión) (véase el apéndice 2 para el procedimiento de Ultra Turrax).
  - El tiempo y la RPM dependerá de la muestra.
- Ejemplo 3
- Producción de microgránulos (englobado)
- Finalidad: Para el suministro de productos bioactivos al íleon próximo para una protección térmica contra las condiciones de tratamiento ambientales y suministro gástrico
- La solución de proteína de guisante desnaturalizada preparada según el ejemplo 1 o 2 puede ser combinada con componentes activos, es decir probióticos, colores, etc.
- La dispersión de solución de proteína de guisante desnaturalizada + componente activo se extruye a través de un orificio para una caída libre en un baño de polimerización.
- El baño de polimerización está compuesto por ácido cítrico (0,5 M) NaCl (0,3 M), (0,4 M) y polisorbato 80 (0,1 %).
- Se optimiza la amplitud y se ajusta la magnitud de la carga positiva para generar una corriente estacionaria de microgotitas en caída libre. El baño de polimerización se ajusta a una temperatura de 37° C con una distancia de caída libre de 16 cm desde el orificio y una velocidad de agitación de 90 RPM para permitir la polimerización instantánea de la solución de proteína de guisante desnaturalizada y el componente activo en forma de microgránulos.
- Los microgránulos se dejan curar en el tampón de polimerización con una velocidad de agitación baja durante 2 horas a temperatura ambiente.
- Ejemplo 4

## Producción de microcápsulas

Finalidad: Suministro de proteína de guisante nativa al íleon próximo para la liberación estimuladora de hormonas de saciedad GLP-1 y para la supresión del apetito

- 5 Se prepararon microcápsulas monodispersadas y mononucleares usando la técnica de rotura de chorro laminar de coextrusión. El encapsulador se equipó con una o dos boquillas concéntricas de tamaños diferentes (interna y externa).

Se preparó una solución de proteína de guisante desnaturalizada (7% p/v) según el ejemplo 1 o 2.

- 10 La solución de proteína de guisante desnaturalizada se suministra a la boquilla externa usando un sistema de regulación de presión de aire que hizo posible que se generaran caudales de 1-3 l/min usando una presión máxima en cabeza de 0,5-0,8 bares.

El caudal deseado se ajustó usando una válvula de reducción de la presión. La fase interna (proteína nativa, no desnaturalizada) se suministró usando una bomba de jeringuilla de presión conectada a la boquilla interna para suministrar la fase interna a caudales entre 5 y 15 l/min.

Si se añade un producto bioactivo, será incorporado en la fase interna.

- 15 Se obtuvieron microcápsulas esféricas mediante la aplicación de una frecuencia de vibración ajustada, con una amplitud definida, al chorro de líquido coextruido que consiste en proteína de guisante desnaturalizada y la proteína nativa del núcleo.

El material en la boquilla interna y externa se calientan ambos a 40° C con el fin de permitir una mejor capacidad de flujo en operaciones comerciales.

- 20 El chorro concéntrico resultante se rompió en forma de microcápsulas que cayeron en un baño gelificante con agitación magnética 20 cm por debajo de la boquilla.

El baño gelificante consistía en 36 g/l de ácido cítrico, MOPS 10 mM, pH 4,0.

Se añadió Tween 80 (0,1-0,2% (v/v)) para reducir la tensión superficial de la solución gelificante.

- 25 Para evitar la coalescencia de las microcápsulas durante la rotura del chorro y/o durante la entrada en el baño gelificante, se indujo una carga negativa elevada sobre su superficie usando un sistema de voltaje electrostático que aplicó un potencial eléctrico de 0-2,15 kV entre la boquilla y un electrodo, colocado directamente por debajo de la boquilla.

A medida que las microcápsulas caían a través del electrodo, fueron desviadas de su posición vertical dando lugar a que su impacto se produjera sobre un área más amplia en la solución gelificante.

- 30 Las microcápsulas se dejaron endurecer durante al menos 30 minutos para asegurar una gelificación completa y, seguidamente se lavaron y se filtraron usando una malla porosa para separar cualesquiera compuestos sin reaccionar.

## Ejemplo 5 (comparativo)

### Producción de microgránulos (englobado)

- 35 Se producen microgránulos según el ejemplo 3, pero usando una solución de proteína de guisante desnaturalizada que no se puso en reposo antes de la desnaturalización con calor. Los microgránulos resultantes se muestran en la Fig. 13.

Caracterización de microgránulos del ejemplo 3 y microcápsulas del ejemplo 4 y 2.

## Análisis de la distribución de tamaños

La distribución media de tamaños de las cápsulas de proteína de guisante fue validada para asegurar la capacidad de reproducción del procedimiento de producción. Se calcularon los valores de  $D(v, 0.9)$  (tamaño al que el volumen acumulado alcanza un 90% del volumen total) de tandas encapsuladas usando un difractor láser con un intervalo de 0,2-200  $\mu\text{m}$ . Para el análisis del tamaño de partículas, las tandas se volvieron a poner en suspensión en agua Milli-Q y la distribución de tamaños se calculó basada en los datos de distribución de la intensidad luminosa de la luz dispersada.

## Contenido de proteínas:

El contenido de proteínas (nitrógeno  $\times 6,25$ ) se determinó usando métodos estándar (AOAC, 1990). Se pusieron en suspensión aislados de proteínas (200 mg) en 20 ml de agua desionizada y el pH de las suspensiones se ajustó entre 2,0 y 9,0 usando soluciones de HCl o NaOH 0,1 N. Estas suspensiones se agitaron magnéticamente durante 1 h. Se comprobó el pH y se ajustó si fuera necesario, seguidamente se centrifugó a  $8.000 \times g$  durante 10 minutos. El contenido de proteínas ( $N \times 6,25$ ) de la materia sobrenadante se calculó mediante estimación del contenido de nitrógeno (método de Kjeldahl).

15 Potencial Zeta  $\zeta$  e hidrofobicidad superficial ( $H_0$ )

Se determinaron el potencial zeta  $\zeta$  y la hidrofobicidad superficial ( $H_0$ ) para los microgránulos y microcápsulas de proteína de guisante. El potencial zeta ( $\zeta$ ) de los aislados de proteína se midió usando un dispositivo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., Reino Unido). Los microgránulos y microcápsulas de proteína recientemente preparados se pusieron en suspensión en agua desionizada antes del análisis. La hidrofobicidad superficial ( $H_0$ ) de los microgránulos/microcápsulas de proteína de guisante se estimaron usando una sonda hidrófoba ANS siguiendo el método de Kato and Nakai, 1980 (hidrofobicidad determinada mediante un método de sonda de fluorescencia y su correlación con propiedades superficiales de proteínas, Biochim Biophys Acta. 24 de Julio de 1980; 624(1):13-20). Las dispersiones de encapsulación se incubaron en la oscuridad durante 15 minutos y se midió la intensidad de la fluorescencia (FI) a longitudes de onda de excitación y emisión de 390 y 470 nm, respectivamente, usando un espectrómetro de fotoluminiscencia/fluorescencia. Las FI de soluciones de proteínas de blancos de ANS y diluidas sin ANS se midieron también y se sustrajeron de las FI de las dispersiones de proteínas encapsuladas con ANS. La pendiente inicial del gráfico de la concentración de proteína frente a FI corregida se calculó mediante un análisis de regresión lineal y se usó como un índice de proteína  $H_0$ . Los resultados se muestran en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

| Formato       | Contenido de proteína (%) | Potencial zeta $\zeta$ (mV) | Hidrofobicidad superficial ( $H_0$ ) |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Microgránulos | 94,35% $\pm$ 0,34%        | -48,32 mV $\pm$ 2,31 mV     | 587 $\pm$ 21,23                      |
| microcápsulas | 94,08% $\pm$ 0,21%        | -41,32 mV $\pm$ 1,92 mV     | 522 $\pm$ 19,62                      |

## FTIR

Se registraron espectros infrarrojos de microgránulos y microcápsulas de proteínas de guisantes usando un espectrómetro FTIR (Vertex 70, Bruker Optics Inc., Alemania) equipado con una celda de reflectancia total atenuada (ATR) (PIKE Technology Inc., EE.UU.). Las microcápsulas/microgránulos de proteína se almacenaron en desecadores sobre  $P_2O_5$  durante más de dos semanas con el fin de suprimir la humedad. Los aislados exentos de humedad se colocaron en un cristal de ATR y se comprimieron para asegurar un buen contacto. El espectrómetro fue continuamente purgado con aire seco. Se registraron los espectros en el intervalo de  $4.000-600 \text{ cm}^{-1}$  (promedio de 120 espectros a una resolución de  $4 \text{ cm}^{-1}$ ) y la referencia frente a una celda vacía.

Los espectros se sometieron a un análisis de autodesconvolución de Fourier (FSD), derivada segunda (SD) y procedimientos de ajuste de la curva para ubicar los picos de solapamiento en la región de amida-I ( $1700-1600 \text{ cm}^{-1}$ ).

<sup>1</sup>). La Figura 4 siguiente ilustra el contraste en la estructura secundaria de microgránulos y microcápsulas preparados a partir de proteína de guisante. El gráfico ilustra también la diferencia entre microgránulos de proteína láctea con relación a los compuestos por proteína de guisante. Por tanto, la estructura secundaria es diferente y la polimerización de la materia será también diferente durante la encapsulación.

## 5 Microscopía

Además del microscopio óptico, se realizaron análisis de imágenes adicionales usando un microscopio láser de exploración confocal Leica TCS SP5 (CSLM) para los fines de una valoración de la morfología de las micropartículas. La figura 5 ilustra la distribución de tamaños homogénea de las microcápsulas de proteína de guisantes (diámetro medio de 150 micrómetros). La Figura 5 b muestra adicionalmente la encapsulación de probióticos en un microgránulo de proteína de guisante con una distribución celular preferida a través de la totalidad del microgránulo. Se utilizó también el sistema confocal para demostrar la distribución uniforme de material bioactivo, es decir, *Lactobacillus rhamnosus* (GG) de una microcápsula después del procedimiento de producción. La Figura 6 demuestra que el procedimiento de microencapsulación no es perjudicial para la supervivencia de probióticos.

El análisis confocal se realizó mediante iluminación usando un láser de Argón (excitación láser de 488 nm) u se adquirieron imágenes rojas-verdes-azules (24 bits), 512 x 512 píxeles usando un factor de zoom de 2,0 proporcionando una resolución de píxeles final de 0,2 µm /píxel.

Se utilizaron también microscopía de fuerza atómica (ACM; Asylum Research MFP-3D-AFM) y microscopía de barrido electrónico (SEM) para investigar el carácter significativo y la magnitud de las interacciones electrostáticas entre probióticos y proteína de guisante durante la encapsulación. La Figura 7 ilustra la topografía superficial de un microgránulo de proteína de guisante (Fig. 7<sup>a</sup>) y una microcápsula de proteína de guisante (Fig. 7B). Está claro que la superficie de un microgránulo tiene más fracturas y posibles poros con relación a la superficie de una microcápsula. Por tanto, la cápsula de proteína de guisante potencialmente tendrá una mayor capacidad para resistir los efectos de la difusión y transferencia de masa, es decir, la absorción de agua. Las microcápsulas ilustran también la capacidad del producto para proteger el aceite de kril y los ácidos grasos (DHA y ARA) contra la oxidación.

Método para determinar la solubilidad de la solución de proteína de guisante

Una técnica estándar para determinar la solubilidad del compuesto acuoso termodinámico es el método del frasco de agitación.

Los estudios de solubilidad de la proteína de guisante se determinaron equilibrando una cantidad en exceso de proteína de guisante en soluciones tamponantes de pH 1,2, 4,5, 6,8, 7,5 y agua purificada. Los ensayos se realizaron en matraces de plástico con una capacidad de 50 ml. En cada frasco se añadieron 10 ml de medios/agua y la cantidad respectiva de proteína de guisante separadamente. La cantidad fue suficiente para saturar cada medio, que se caracterizó mediante el depósito de sustancia no solubilizada. Se usó un agitador incubador para mantener las muestras a 37° C durante el ensayo con una agitación a 150 rpm durante 72 horas (hasta que se consiguió un estado de equilibrio). Después de este período, las muestras fueron inmediatamente filtradas (0,45 µm) y diluidas en un matraz volumétrico con los medios correspondientes. Para la cuantificación de proteína de guisante, se usó un espectrofotómetro UV-Vis (Varian) a 214 nm y 280 de longitud de onda de absorción de proteína para cada medio. Los valores de la solubilidad se calcularon usando curvas de calibración predeterminadas para fuentes de proteínas solubles.

Con los resultados de la solubilidad, se calculó la relación de dosis:solubilidad, que se obtuvo dividiendo la dosis comercialmente aceptable de la proteína de guisantes (en miligramos por la solubilidad en miligramos por mililitro) obtenida en los ensayos. Los valores de la relación de dosis:solubilidad se compararon seguidamente con los criterios establecidos por la guía del fabricante de ingredientes para verificar si la proteína es altamente soluble o no.

Método para determinar el % de proteína de guisante desnaturalizada

La evaluación de la desnaturalización de proteína de guisante implica tres etapas de análisis esenciales:

- Determinación de la concentración de proteína de guisante

- Preparación de la ecuación de la reacción

- Medición de la electroforesis, turbidez y aglomeración

i) Determinación de la concentración de proteína de guisante

- 5 La concentración de proteína de guisante se determinó mediante HPLC de fase inversa usando una columna Source® 5RPC (Amersham Biosciences UK limited). El sistema de HPLC consistió en un módulo de separación Waters 2695 con un detector de la absorbancia de la longitud de onda Dual Waters 2487.

Preparación de la ecuación de reacción

La cinética de desnaturalización de la proteína de guisante se determinó según la siguiente ecuación:

10 
$$dC/dt = -kC^n$$

en la que k es la velocidad de reacción, n es el orden de la reacción y C la concentración de proteína de guisante nativa. Esta ecuación puede ser integrada para proporcionar

$$(C_t/C_0)^{1-n} = 1 + (n-1)kt \text{ (para } n > 1)$$

- 15 En la que  $C_t$  es la concentración de proteína de guisante nativa para un tiempo t,  $C_0$  es la concentración de proteína de guisante inicial.

Una reordenación adicional proporciona

$$C_t/C_0 = [1 + (n-1)kt]^{1/1-n}$$

Se tomó el log natural de esta ecuación

$$\ln(C_t/C_0) = [1/(1-n)] \ln[1 + (n-1)kt]. \text{ (ecuación 1)}$$

- 20 El registro de datos de riesgos como estos iguala los datos por tiempo unitario y reduce el error al resolver las ecuaciones. Los órdenes y las velocidades de reacción se determinaron ajustando los datos experimentales para la ecuación 1. Todos los puntos experimentales fueron incluidos en el ajuste de la curva; esto es razonable considerando el corto tiempo de calentamiento de la solución de proteína. La introducción de un lapso de tiempo para los datos no alteró significativamente los resultados obtenidos. Los datos fueron ajustados también para la
- 25 ecuación de riesgo de primer orden,

$$\ln(C_t/C_0) = -kt \text{ (ecuación 2)}$$

Para regular posibilidad de cinéticas de primer orden.

iii) Análisis de HPLC

- 30 Se usó una cromatografía de exclusión de tamaños a presión elevada para estudiar los agregados asociados a disulfuro. Los agregados formados durante la fase de calentamiento fueron tratados con un tampón que comprendía bis-tris 20 mM pH 7,0 SDS al 5% y yodoacetamida 50 mM (IAA). Los agregados tratados se agitaron durante una noche a temperatura ambiente y se filtraron a través de un filtro de jeringuilla de 0,45 µm antes del análisis. Se usó un sistema de cromatografía ÄKTA Purifier (Amersham Bioscience UK limited) con columnas TSK G2000 y TSK G3000 (TosoHaas, Montgomeryville, PA. EE.UU.) en serie para la separación. El eluyente fue tampón de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,0 que contenía 1% de SDS. Se usó un colorante, blue dextran 2000, para determinar el
- 35 volumen vacío de las columnas. La determinación de grupos amino ( $NH_2$ ) libres se realizó a través de la metodología del ácido 2,4,6-trinitrobenzeno-1-sulfónico (TNBS) de Adler-Nissen, 1979 (Determination of the degree of hydrolysis

of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid, J. Adler-Nissen J. Agric. Food Chem., 1979, 27 (6), 1256-1262).

#### iv) Medición de la electroforesis, turbidez y aglomerados

Se realizó una electroforesis bidimensional según los métodos previamente descritos (Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227(5259): 680-5.). el tampón en funcionamiento usado estaba exento de  $\beta$ -Mercaptoetanol debido al efecto de disociación que tiene sobre la proteína. Esto provocó que la rotura de los agregados de proteína reduciendo los enlaces intra-e inter-moleculares de disulfuro. La tira de gel se colocó sobre la parte superior del gel de separación que consistía en 12% de acrilamida y 4% de gel de acumulación, que contenían ambos 0,1% de SDS. La electroforesis se llevó a cabo usando un voltaje constante de 155 V en un sistema Mini Protean II (Bio-Rad, Alpha Technologies, Dublin, Irlanda). Los geles se tiñeron con azul brillante Coomassie R250 al 0,5%, isopropanol al 25%, solución de ácido acético al 10%. La turbidez de las soluciones de proteínas de guisantes desnaturalizadas se midió usando un espectrofotómetro UV/visible Varian Cary1 (JVA analítica, Dublín, Irlanda) a una longitud de onda de 590 nm. A medida que aumentaba el tamaño y/o el número de agregados, se dispersó más luz, dando lugar a un aumento de la absorbancia aparente de las soluciones; por tanto, en correlación con la cinética de desnaturalización. Se usó también una dispersión de la luz dinámica (Malvern Zetamaster; model 7EM; Malvern Instruments Ltd, Worcester, Reino Unido) para medir los tamaños de los agregados formados durante la etapa de calentamiento de la proteína de guisante. La luz dispersada se detectó a un ángulo fijo de 90°. Se usó el método acumulativo para encontrar el valor medio (z-media) o el tamaño de una partícula que correspondía a la media de la distribución de la intensidad.

#### 20 Flexibilidad/estabilidad gastrointestinal *ex vivo*

Con el fin de determinar la eficacia de los microgránulos/microcápsulas de proteína de guisante como un vehículo de suministro, es importante dilucidar las condiciones gástricas y la posterior digestión en las condiciones intestinales. Con el fin de evaluar estas condiciones, se realizaron estudios gastrointestinales usando contenidos de estómago e intestinales obtenidos a partir de cerdos sacrificados (condiciones *ex vivo*). Las condiciones estomacales eran de pH 1,6 y se midió la actividad de enzima pepsina (equivalentes de  $44,46 \pm 2,34$   $\mu$ mol de tirosina). Los contenidos estomacales se obtuvieron a partir del íleon próximo y se investigó adicionalmente la actividad enzimática. Se midió la actividad de tripsina a  $21,39 \mu\text{mol} \pm 2,13$  y la actividad de quimotripsina se midió a  $319,43 \pm 23,85$   $\mu$ mol.

La Figura 8 ilustra la estabilidad ácida de microgránulos / microcápsulas de proteína de guisante durante la digestión en el estómago porcino *ex vivo* durante 3 horas de incubación. Los microgránulos / microcápsulas permanecen enteros y después de 3 horas la superficie comienza a contraerse, posiblemente, en respuesta al gradiente ácido entre el núcleo del gránulo y el entorno exterior. La Fig. 8A y 8B muestran el cambio visual en la apariencia de los microgránulos durante una incubación de 3 horas; sin embargo, la estructura permanece intacta. La Fig. 8C ilustra la digestión de estos microgránulos durante una incubación intestinal en presencia de tripsina, quimotripsina y otras enzimas intestinales típicas. La resistencia de los microgránulos durante la incubación en el estómago se muestra en la Fig. 10 e ilustra que la resistencia de los microgránulos disminuye durante la incubación en el estómago; sin embargo, la resistencia global de los microgránulos permanece relativamente elevada ( $632,32 \text{ g} \pm 24,32 \text{ g}$ ). La digestión intestinal de los microgránulos de proteína de guisante se puede observar en la Fig. 10 en la que la cromatografía de permeación sobre gel selecciona la liberación de péptidos.

#### Encapsulación de probióticos en microgránulos de proteína de guisante

A continuación de la caracterización del microgránulo en cuanto a la resistencia en el estómago y la digestión intestinal se encapsuló una cepa de probiótico en microgránulos de proteína de guisante y se evaluó la supervivencia celular durante i) el procedimiento de encapsulación (Fig. 10; tensión de calor (Fig.11). La Figura 10 ilustra las condiciones suaves utilizadas para la encapsulación de probióticos en proteína de guisante. La Figura 11 ilustra la supervivencia de probióticos en presencia de una tensión de calor. Este gráfico ilustra la protección frente al calor proporcionada por la encapsulación (estructura de un microgránulo), que es significativamente más elevada que la proporcionada por la proteína de guisante sola.

Datos en seres humanos obtenidos para el suministro de cápsulas de proteína de guisante nativa al íleon

Diseño del estudio en seres humanos:

Cuatro participantes fueron incubados con un catéter nasoduodenal de 145 cm

El catéter se introdujo en el estómago y la punta se colocó en el intestino bajo una guía radiológica y verificación

A continuación de un ayuno durante una noche, se instruyó a los participantes para que consumieran el prototipo encapsulado en 5 minutos (volumen de 40 ml + aprox. 120 ml de agua)

- 5 Durante la infusión intraduodenal de bebida, se realizó una infusión de fluido durante 10-200 minutos

Después de 180-220 minutos, el catéter nasoduodenal se retiró y se permitió que los sujetos comieran a demanda

La posición del catéter se muestra en la parte derecha

La tabla 2 siguiente ilustra la posición del catéter en el intestino del sujeto

Tabla 2

10

| Orificios del catéter                                                            | Centímetros desde la nariz | Ubicación      |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------|
| 5                                                                                | 80                         | Duodeno        |
| 7                                                                                | 105                        | Yeyuno próximo |
| 6                                                                                | 120                        | yeyuno         |
| 3                                                                                | 130                        | Yeyuno         |
| 4                                                                                | 155                        | Yeyuno         |
| 2                                                                                | 170                        | Íleon          |
| 1                                                                                | 185*                       | Íleon          |
| * (el orificio 1 está a -5 cm, la numeración del catéter es desde -10 hasta 255) |                            |                |

Resultados:

- 10-35 minutos: visualización de microcápsulas intactas en el duodeno

- 10-15 minutos: sin aumento significativo del contenido de proteínas o péptidos en las regiones duodenales, yeyunales o ileales

- 15 - 35-90 minutos: detección de la rotura de las microcápsulas en regiones yeyunales

- 35-120 minutos: aumento aparente del contenido de proteína en regiones yeyunales

- 90+ minutos: aparición espontánea de proteína de guisante nativa en yeyuno próximo e íleon

- 90+ minutos: presencia acumulada de péptidos en yeyuno próximo e íleon

- 180+ minutos: sin aparición de proteína de guisante nativa en yeyuno próximo e íleon

20

## REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una solución de proteína de guisante desnaturalizada, que comprende las etapas de:
 

solubilizar de forma sustancial pero no completa proteína de guisante en un disolvente alcalino a un pH 10 o mayor, o aplicar ultrasonidos a una dispersión o dispersión parcial o disolución parcial de la proteína en un disolvente que

5 tiene un pH de aproximadamente 6-9, para proporcionar una solución de proteína de guisante al 6-9% (p/v);

dejar en reposo la solución de proteína de guisante solubilizada durante al menos 15 minutos para solubilizar e hidratar adicionalmente la proteína de guisante;

calentar la solución de proteína de guisante en reposo bajo condiciones suficientes para desnaturalizar con calor al

10 menos un 90% de la proteína de guisante, mientras se mantiene la solución en una zona adecuada para una extrusión; y

enfriar activamente la solución de proteína de guisante desnaturalizada para acelerar el enfriamiento y evitar la gelificación;

en que al menos un 90% en peso de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada

15 está presente en forma de un agregado de proteína de guisante soluble según se determina mediante el método de frasco de agitación como se describe a continuación bajo el epígrafe "método para determinar la solubilidad de una solución de proteína de guisante".
2. Un método según la reivindicación 1, en el que la proteína de guisante es solubilizada de forma sustancial pero no completa en un disolvente alcalino para proporcionar una solución de proteína de guisante que tiene un pH de al menos 10.
- 20 3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que la proteína de guisante es solubilizada de forma sustancial pero no completa en un disolvente alcalino para proporcionar una solución de proteína de guisante que tiene un pH de 10 a 11.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la solución de proteína de guisante desnaturalizada y enfriada se centrifuga para separar la materia insoluble.
- 25 5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la proteína de guisante es solubilizada mediante ultrasonidos, de forma que la proteína de guisante es dispersada en agua desionizada, tampón de fosfato o borato antes de la aplicación de ultrasonidos.
6. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la proteína de guisante se selecciona entre un aislado de proteína de guisante (PPI) o un concentrado de proteína de guisante (PPC).
- 30 7. Una solución de proteína de guisante desnaturalizada según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende 6-9% (p/v) de proteína de guisante desnaturalizada, en que al menos un 90% (p/p) de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada está presente en forma de un agregado de proteína de guisante soluble según se determina mediante el método del frasco de agitación anteriormente descrito bajo el epígrafe "método para determinar la solubilidad de la solución de proteína de guisante", en que la solución
- 35 tiene una viscosidad que es suficientemente baja para permitir que la solución sea extruida en forma de microgotitas.
8. Una solución de proteína de guisante desnaturalizada según la reivindicación 7, en la que al menos un 95% (p/p) de la proteína de guisante en la solución de proteína de guisante desnaturalizada está presente en forma de un agregado de proteína de guisante soluble según se determina mediante método del frasco de agitación como se describe con anterioridad bajo el epígrafe "método para determinar la solubilidad de una solución de proteína de
- 40 guisante".
9. Un método para producir micropartículas que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada,

comprendiendo el método las etapas de:

proporcionar una solución de proteína de guisante desnaturalizada según la reivindicación 7 o la reivindicación 8,

tratar la solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas; y

5 reticular y quelar las microgotitas, en que la etapa de reticulación y la quelación de las microgotitas comprende gelificar inmediatamente las microgotitas en un baño gelificante ácido que tiene un pH que es menor que el pH de la proteína de guisante, para formar micropartículas.

10. Un método según la reivindicación 9, en el que la etapa de tratamiento de la solución de proteína de guisante desnaturalizada para formar microgotitas comprende la etapa de extruir la solución a través de un montaje de boquillas para formar las microgotitas.

10 11. Un método según la reivindicación 10, en el que el agente activo es añadido a la solución de proteína de guisante desnaturalizada antes de la etapa de formación de las microgotitas y, opcionalmente, después de la etapa de calentamiento.

15 12. Un método según la reivindicación 10, en el que el montaje de boquillas comprende una boquilla única y en que las micropartículas son microgránulos que tienen una matriz de proteína de guisante desnaturalizada continua con el agente activo distribuido por toda la matriz de proteína de guisante desnaturalizada.

20 13. Un método según la reivindicación 10, en el que el montaje de boquillas comprende una boquilla externa dispuesta de forma concéntrica alrededor de una boquilla interna y en el que la solución de proteína de guisante desnaturalizada es extruida a través de la boquilla externa y una solución de agente activo que comprende el agente activo es simultáneamente extruida a través de la boquilla interna y en que las micropartículas son microcápsulas que tienen una corteza de proteína de guisante desnaturalizada y un núcleo que comprende el agente activo.

14. Un método según la reivindicación 13, en el que el montaje de boquillas comprende un sistema de voltaje electrostático configurado para aplicar un potencial eléctrico entre la boquilla y un electrodo dispuesto por debajo de la boquilla.

25 15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, que incluye una etapa adicional de revestir las micropartículas, microgránulos o microcápsulas formados en quitosano o gelatina, en que el revestimiento se realiza mediante inmersión de las micropartículas, microgránulos o microcápsulas en un baño de quitosano o gelatina.

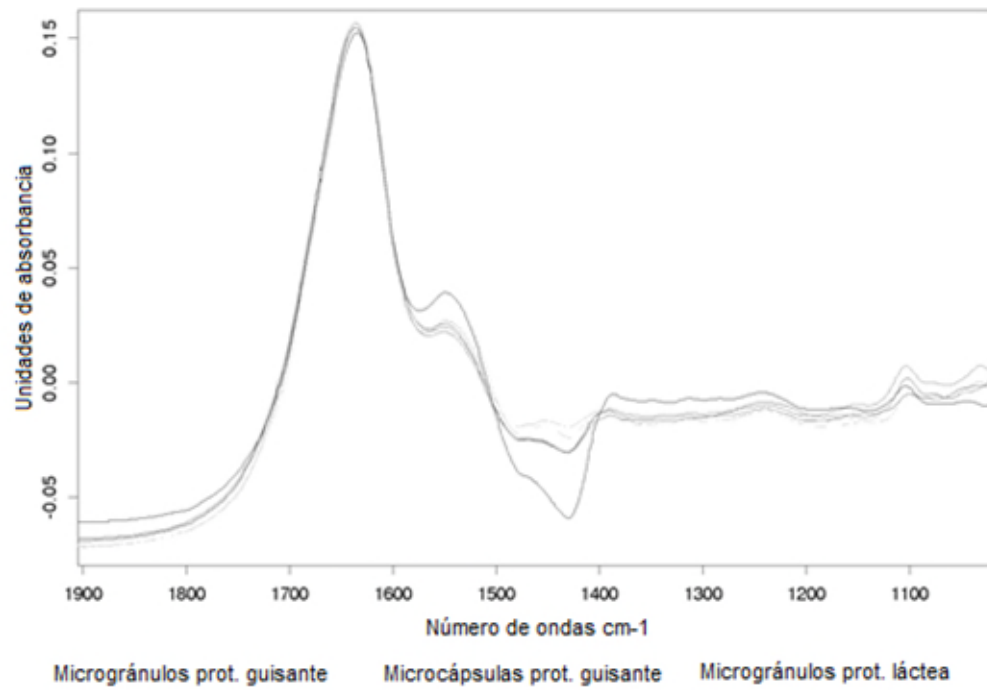


**FIG. 1**

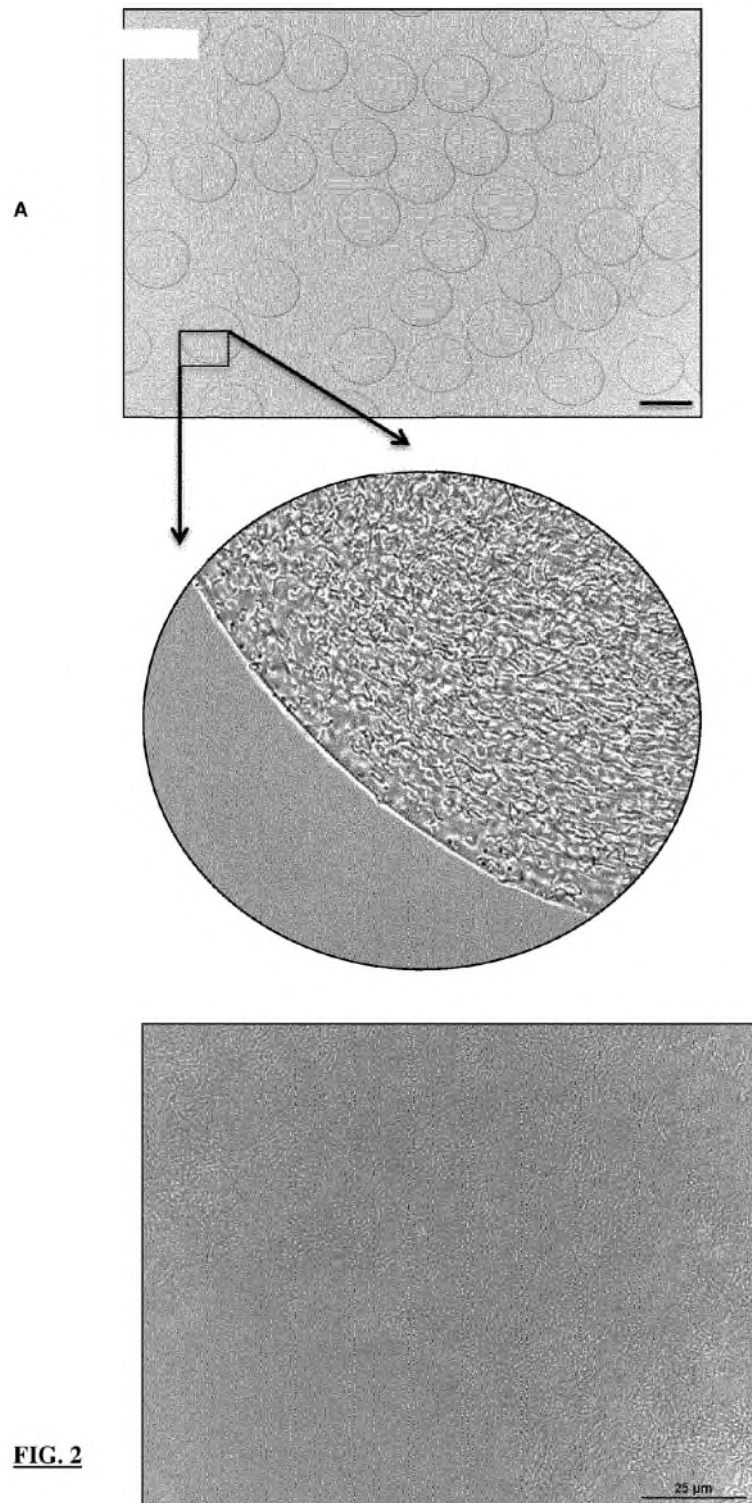


**FIG. 3A**

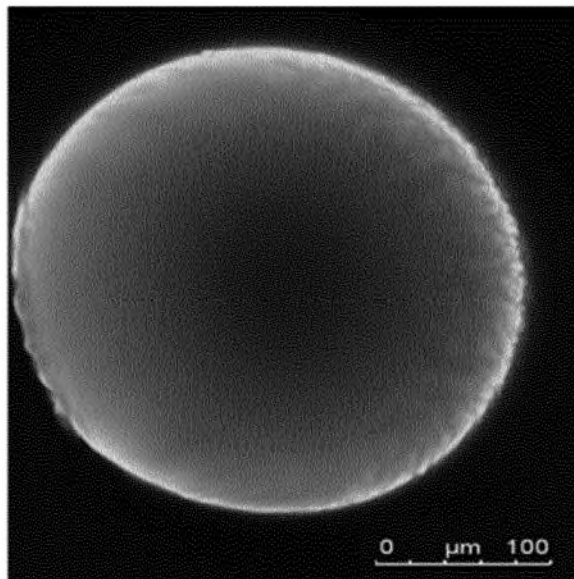


**FIG. 3B**

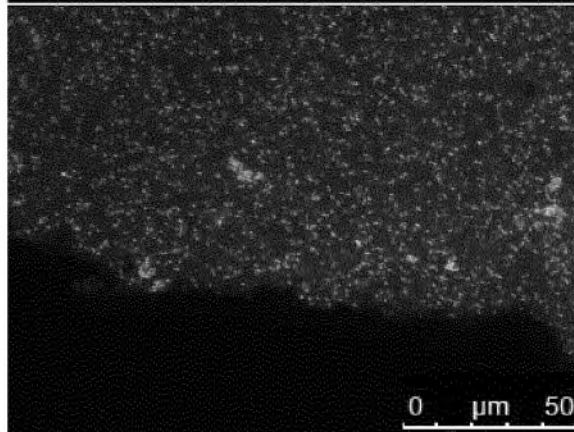
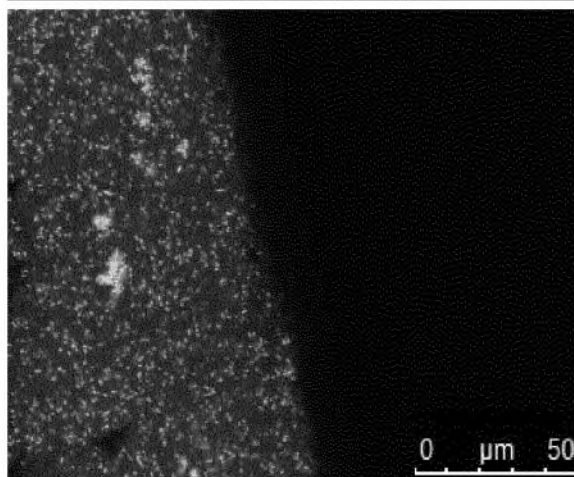
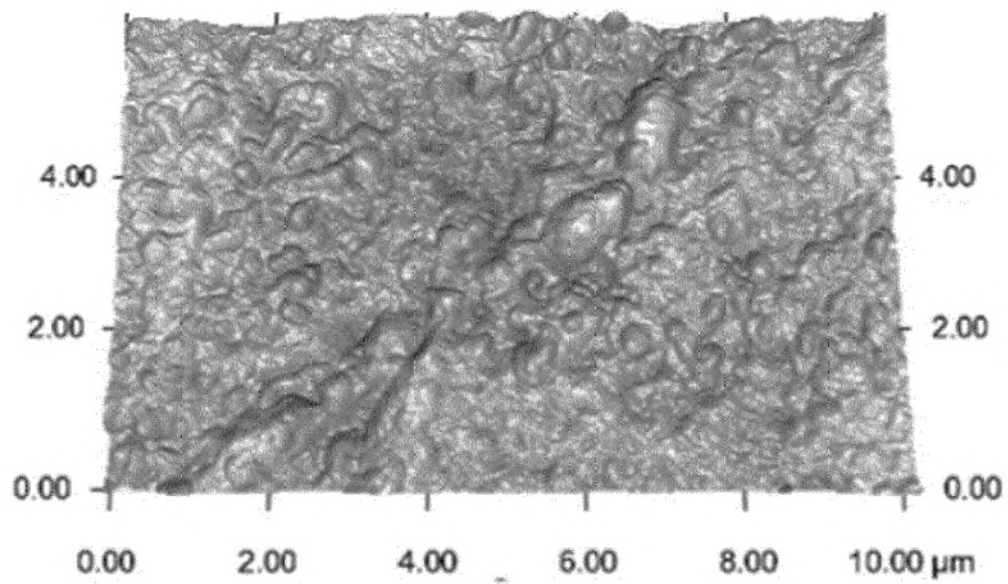
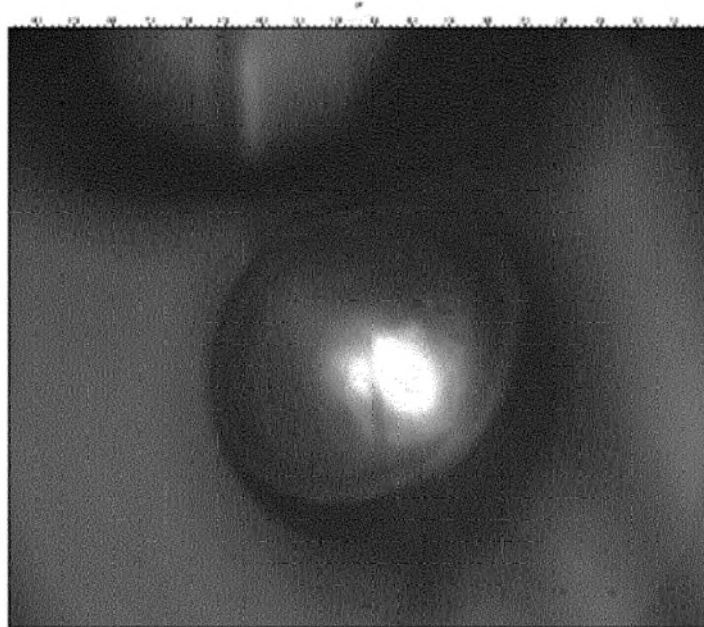


**FIG. 3C**



A



B

FIG. 4

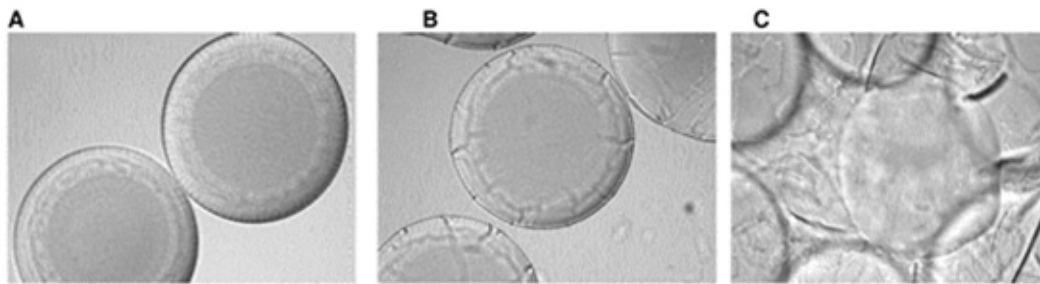


**FIG. 5**

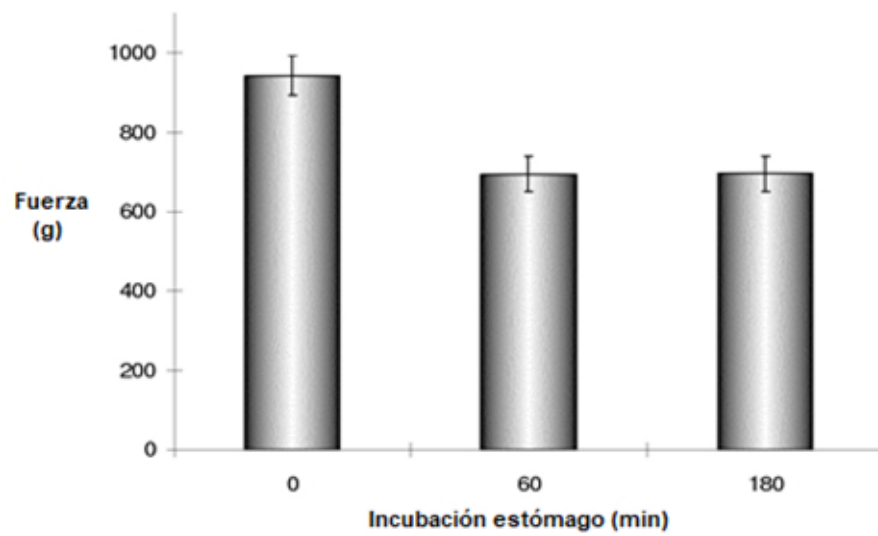


**FIG. 6**

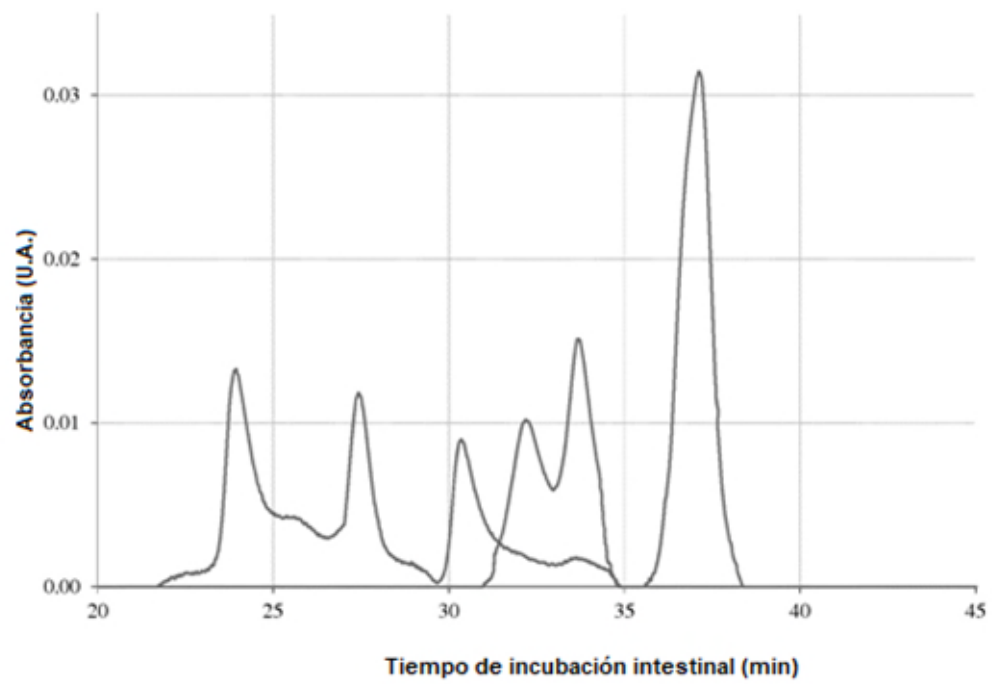
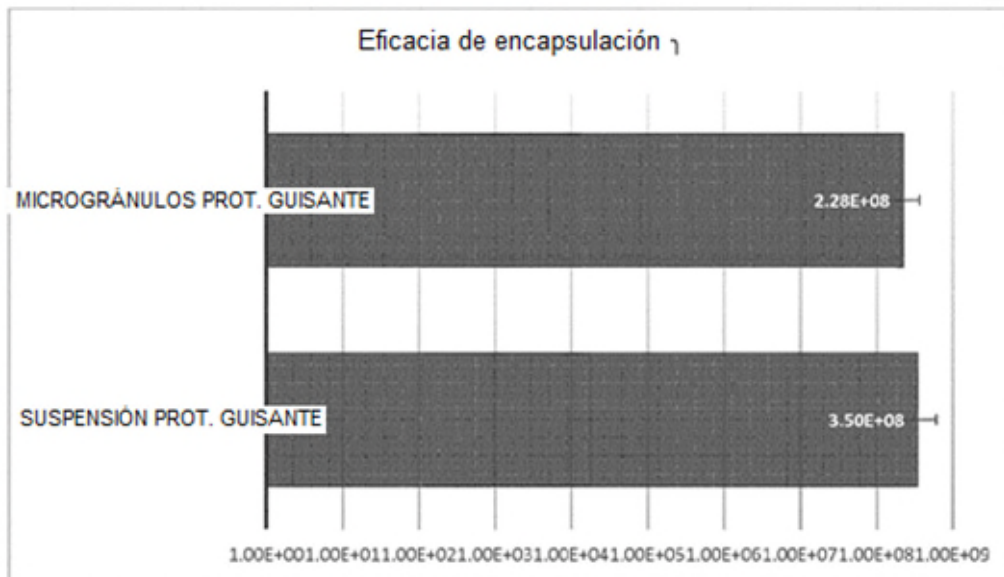
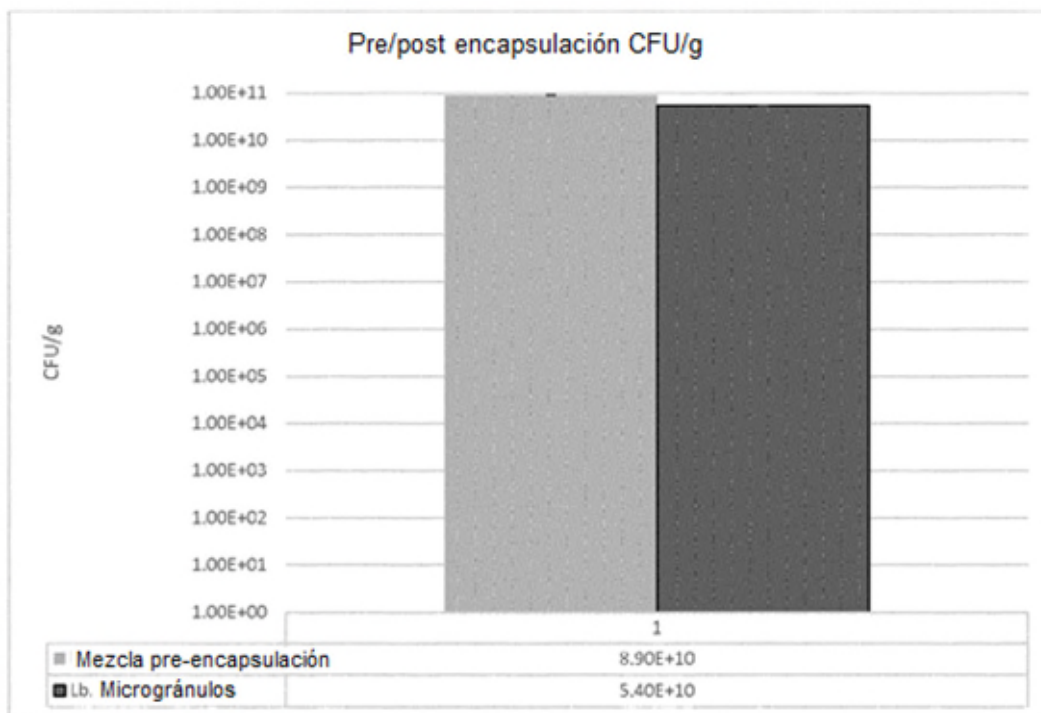


**FIG. 7**



**A**



**B**

**FIG. 8**

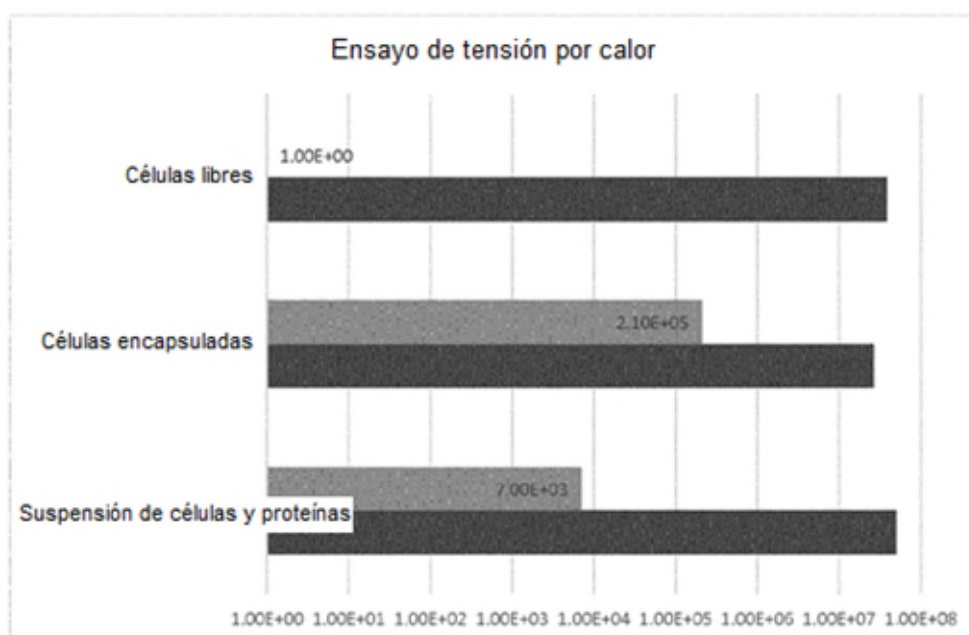


**FIG. 9**

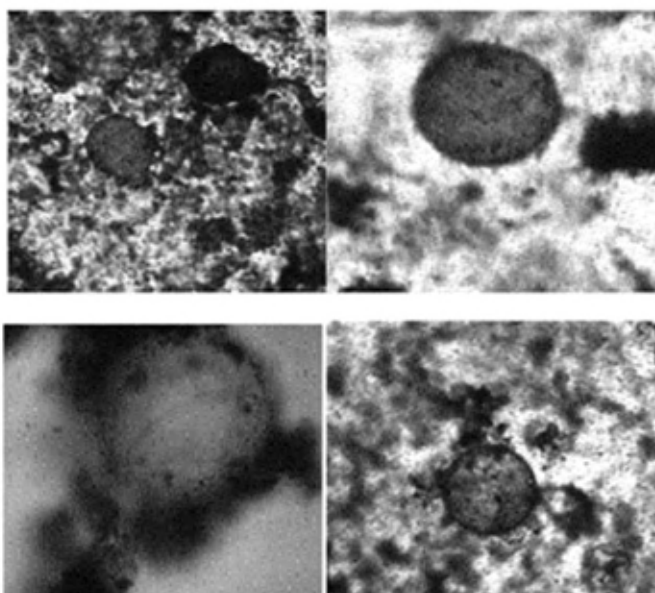


**FIG. 10**

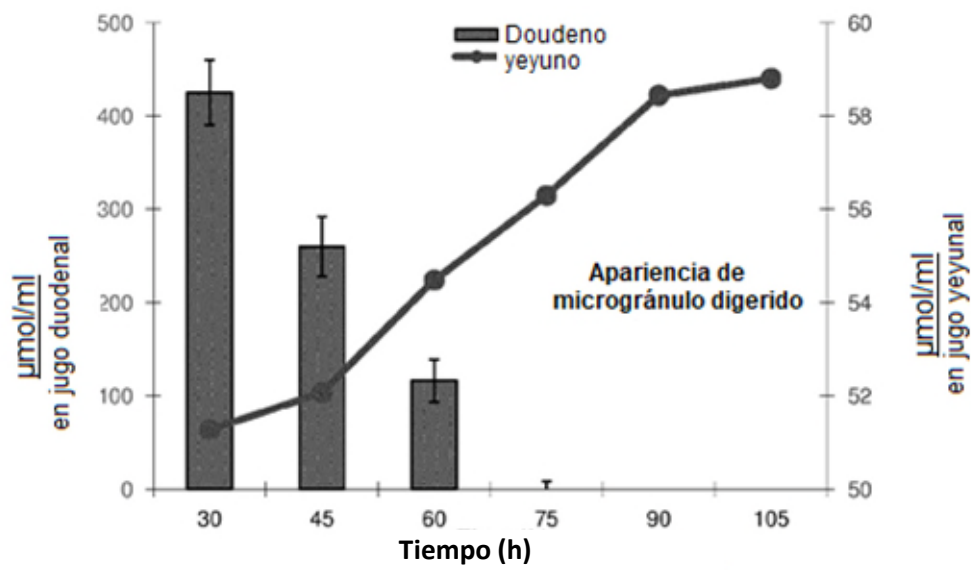


**FIG. 11**

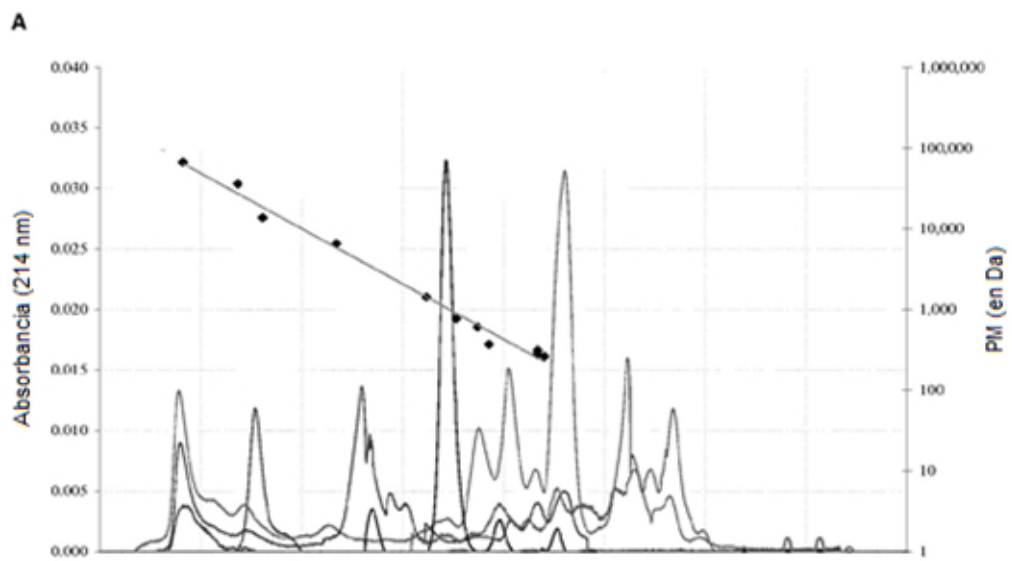


**FIG. 12A**

**FIG. 13**

