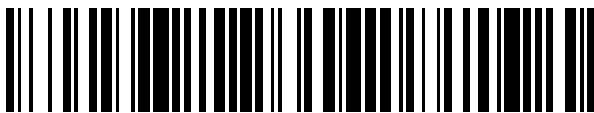




OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 376 439**

⑯ Número de solicitud: 201132015

⑮ Int. Cl.:
C12N 9/10 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO

B2

⑯ Fecha de presentación: **15.12.2011**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2012**

Fecha de la concesión: **14.06.2012**

⑯ Fecha de anuncio de la concesión: **26.06.2012**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
26.06.2012

⑯ Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA
Centro de Innovación e Transferencia de
Tecnoloxía. Edificio EMPRENDIA - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑯ Inventor/es:

**VÁZQUEZ VÁZQUEZ, Manuel y
GUERRA RODRÍGUEZ, Esther**

⑯ Agente/Representante:

CAROU INSUA, Fernando

⑯ Título: **ADITIVO ALIMENTARIO CONTENIENDO LA ENZIMA TRANSGLUTAMINASA OBTENIDO POR
FERMENTACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO FORMULADOS CON LECHE, PATATA Y
GLICEROL.**

⑯ Resumen:

Aditivo alimentario obtenido por fermentación conteniendo la enzima transglutaminasa a partir de leche, patata y glicerol. La obtención comprende la preparación de un medio de cultivo con leche, patata y glicerol diluidos en agua desionizada; la esterilización del medio de cultivo se realiza conjuntamente a 121°C por 20 minutos; el cultivo de *Streptomyces mobaraensis* durante 72 h a 28°C y agitación de 200 rpm en este medio de cultivo; centrifugación para separar la biomasa del líquido de cultivo; el líquido se liofiliza obteniendo un aditivo alimentario de uso en la gelificación de productos alimenticios altamente proteicos, tales como productos cárnicos, proteínas vegetales y proteínas de pescado o marisco.

ES 2 376 439 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa obtenido por fermentación de medios de cultivo formulados con leche, patata y glicerol.

Sector de la técnica

5 La presente invención tiene por objeto un aditivo alimentario conteniendo la enzima transglutaminasa y el procedimiento para su obtención.

Antecedentes de la invención

10 Se conoce como transglutaminasa a un grupo de enzimas (EC: 2.3.2.13) que cataliza una reacción de transferencia de grupos acilo entre proteínas. Los residuos de glutamina actúan como donadores de grupos -carboxiamida y actúa como acceptor el grupo ϵ - de los residuos de lisina. Aunque en ausencia de estos, puede existir reacción con aminas primarias o con el agua. Cuando los residuos de lisina actúan como aceptores, se forman enlaces ϵ -(γ -glutamilo)lisina produciendo la polimerización de proteínas.

15 Todas las transglutaminasas existentes en los organismos vivos son semejantes; sin embargo, las que no se producen por microorganismos comparten la característica de ser dependientes de los iones Ca^{+2} , además de ser más difíciles de extraer de sus medios naturales, lo cual las hace menos rentables económicamente cuando se llevan a procesos de escala industrial. La transglutaminasa producida por microorganismos es independiente de los iones Ca^{+2} , lo que la hace particularmente interesante en Tecnología de Alimentos.

20 La producción de la transglutaminasa microbiana se realiza mediante fermentaciones en las cuales se obtienen actividades de enzima que se pueden medir de acuerdo al método descrito por Grossowicz et al. (1950, J. Biol Chem. 187: 111-125) en el que una unidad de transglutaminasa microbiana se describe como la formación de 1 μm de ácido L-glutámico β -monohydroxamato durante un minuto a 37°C.

25 La vía de producción de la enzima mediante fermentaciones con microorganismos es muy adecuada debido a que los microorganismos la secretan al medio (metabolito extracelular) por lo que se facilita su obtención. La transglutaminasa se puede obtener a partir de muchos microorganismos. La patente US6190879 sobre un método para identificar microorganismos que producen transglutaminasa, describe una amplia lista de microorganismos productores de la enzima transglutaminasa, indicando medios sintéticos para su producción.

30 Como medios de cultivo para la producción de transglutaminasa se han usado a escala de laboratorio medios sintéticos utilizando reactivos comerciales. La fuente de carbono comúnmente utilizada es glucosa (US6100053 y US6190879, entre otras). Además de glucosa, se ha utilizado sacarosa y almidón, almidón solubilizado y sacarosa, almidón y dextrinas. Pero la producción industrial requiere medios de cultivo que utilicen materias primas más económicas para que la producción industrial pueda ser económicamente interesante. Con esta finalidad solo se han estudiado medios basados en hidrolizados ácidos de paja de sorgo (Tellez et al., 2004. Food Technology and Biotechnology 42, 1-4) y medios basados en hidrolizados ácidos de patata (Patente ES2338200B2). Los primeros tienen el inconveniente de que contienen xilosa como principal fuente de carbono, un monosacárido que no permite obtener elevadas producciones de la enzima. Los segundos tienen el inconveniente de que la obtención de hidrolizados ácidos de patata requiere el uso de un ácido contaminante (ácido sulfúrico), una etapa de neutralización del medio ácido que genera sales también contaminantes, y una etapa de filtración después de la hidrólisis que encarecen el proceso. Además los nutrientes propuestos en esta patente tienen un precio elevado, especialmente el caseinato de sodio y extracto de levadura.

40 45 En el cultivo de patatas se producen grandes pérdidas debido a la existencia de patatas deformes, pequeñas o con defectos, que no son comercializables. Las patatas contienen principalmente almidón en altas concentraciones. Estos polímeros de glucosa pueden ser sometidos a una reacción de hidrólisis liberándose moléculas de glucosa. La reacción de hidrólisis puede ser realizada por dos vías: hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática. Existe numerosa literatura sobre la hidrólisis enzimática de patata (Liu, 2002. Journal of Food Science 67, 2113-2117), y existe una patente en la que se usa la hidrólisis ácida de patata para obtener medios de cultivo para la producción de transglutaminasa (Patente ES2338200B2). En la citada patente se propone la liofilización para obtener un producto en polvo. Sin embargo, este proceso requiere una previa congelación, que daña la enzima transglutaminasa y hace que disminuya el rendimiento del proceso por pérdidas de actividad durante la liofilización.

50 La leche es un alimento que contiene principalmente agua, caseína, sales minerales, vitaminas y lactosa. La lactosa tiene un efecto crioprotector o lioprotector por lo que su presencia mejora el proceso de liofilización disminuyendo las pérdidas de actividad en el mismo.

55 La presente invención proporciona una solución basada en el uso de la patata secada y triturada directamente como componente de medios de cultivo para la producción de la enzima transglutaminasa microbiana, sin necesidad de etapas de hidrólisis ácida ni neutralización del medio ácido obtenido. Sin adición de otros nutrientes como caseinato de sodio, extracto de levadura, sales de magnesio ni fosfatos, los cuales son usados en la patente ES2338200B2.

En la presente invención se propone combinar la patata con leche y glicerol para obtener un medio de cultivo que permite obtener un aditivo alimentario por fermentación contenido la enzima transglutaminasa, en menos tiempo y con un proceso mejorado con menos etapas y con menores pérdidas de actividad enzimática durante la liofilización necesaria para obtener el producto final.

5 **Descripción de la invención**

La presente invención se dirige a un aditivo alimentario en forma de liofilizado en polvo que comprende enzima transglutaminasa, patata, glicerol y leche.

En un aspecto particular, la enzima transglutaminasa de dicho aditivo es independiente de los iones Ca^{+2} . Esto es debido a que esta enzima transglutaminasa se obtiene mediante un procedimiento de fermentación.

10 En un aspecto particular, la invención se dirige a un procedimiento de obtención del aditivo alimentario, que comprende a) la fermentación de la enzima transglutaminasa en un medio de cultivo que comprende al menos cepas microbianas de *Streptomyces mobaraensis*, patata, leche y glicerol b) centrifugación del medio de cultivo y separación de la parte líquida, c) liofilización de la parte líquida.

15 En un aspecto particular, el medio de cultivo comprende únicamente agua desionizada, glicerol, leche y patata. La leche puede ser entera, parcial o totalmente desnatada.

En una realización particular, el medio de cultivo no requiere neutralización o ajuste del pH para permitir el crecimiento de cepas microbianas de *Streptomyces mobaraensis*. En una realización aún más particular, la fermentación se lleva a cabo a 28°C y con una agitación de 200 rpm durante 72 horas.

20 En otro aspecto, la invención se dirige al uso del aditivo alimentario, descrito anteriormente, como ligante de alimentos proteicos. Dichos alimentos proteicos se seleccionan preferentemente entre productos cárnicos, productos pesqueros y mariscos, productos lácteos y derivados vegetales con alto contenido proteico, tales como elaborados de soja. El efecto ligante se basa fundamentalmente en el efecto de la enzima transglutaminasa, pero también tiene un efecto ligante importante el almidón de patata y la caseína de la leche, compuestos que se usan habitualmente en las industrias alimentarias como ligantes y que se encuentran presentes en el producto final.

25 **Descripción detallada de la invención**

Como se comentó con anterioridad, el aditivo alimentario comprende enzima transglutaminasa obtenido por un procedimiento de fermentación. El medio de cultivo después de la fermentación de la mezcla de leche, patata y glicerol y agua forma parte del aditivo alimentario, un producto liofilizado en polvo, contenido la enzima, con la ventaja sobre otros procedimientos de no necesitar etapas de hidrólisis acida, de neutralización ni posteriores etapas de purificación del producto obtenido. La lactosa de la leche no es consumida por el microorganismo por lo que se mantiene en el aditivo alimentario y tiene un efecto lioprotector durante la liofilización.

30 El procedimiento de la presente invención consiste primeramente en la preparación del medio de cultivo cuya composición óptima cualitativa y cuantitativa se describe en la tabla 1 (expresada en gramos por litro), siendo ésta un ejemplo que completa la descripción sin que sea limitante a la realización de la presente invención. Contiene como principal fuente de carbono glicerol, que es consumida por el microorganismo durante la fermentación. El medio de cultivo contiene además leche y patata como inductores de la producción de la enzima. La leche además aporta lactosa que actuará en la etapa de liofilización como lioprotector. No contiene extracto de levadura, ni las sales minerales fosfato sódico, fosfato potásico y sulfato magnésico, usadas en una patente previa. El medio de cultivo propuesto, compuesto de agua, leche, patata y glicerol, se puede esterilizar conjuntamente, lo que constituye 35 también una diferencia con la patente previa citada que requiere la esterilización por separado de algunos componentes del medio de cultivo.

40 El medio de cultivo con los componentes indicados permite el crecimiento de cultivos aislados del suelo y no modificados genéticamente de la especie *Streptomyces mobaraensis* y la producción de la enzima por el microorganismo en tan solo 72 h, cuando otros medios como los que se basan en hidrolizados de patata requieren 45 96 h. Esta mejora se basa en que el nuevo medio de cultivo permite el crecimiento más rápido a 28°C en vez de a los 26°C propuesto para los medios basados en hidrolizados de patata.

Variaciones en las concentraciones incluidas en la tabla 1 permiten también la producción de la enzima, aunque con menores actividad enzimática por unidad de volumen.

TABLA 1. Composición optimizada del medio de cultivo que permite la máxima producción de transglutaminasa por la especie *Streptomyces mobaraensis*.

Componentes	Concentración (g/L)
Leche	500 g/L
Patata	30 g/L
Glicerol	10 g/L

A continuación, para una mayor comprensión de las características y ventajas de la presente invención, se hará referencia a una serie de ejemplos que de forma explicativa completen la descripción anterior, sin suponer en modo alguno que ésta se vea limitada a los mismos.

5 Ejemplo 1.

La preparación de un litro del medio de cultivo se realiza según el siguiente procedimiento:

1º. Se pesan en un matraz 10 g de glicerol y 30 g de patata seca triturada en polvo. Se disuelven en 500 mL de agua desionizada y se le añade 500 mL de leche.

2º. La mezcla se esteriliza con calor húmedo a 121ºC durante 20 minutos en un autoclave.

10 3º. Tras la esterilización, se deja enfriar hasta que la mezcla llegue a una temperatura igual o inferior a 28ºC. Este enfriamiento puede ser natural o forzado utilizando cualquier método de transmisión de calor indirecto. Si su uso no es inmediato, se mantiene en refrigeración a 5ºC.

La producción de la enzima transglutaminasa por el microorganismo en este medio de cultivo se realiza según el siguiente procedimiento:

15 1. Se introduce el volumen deseado de medio de cultivo preparado según el procedimiento anterior en un fermentador consistente en un depósito cilíndrico con un sistema de aspas para agitar de forma continua el medio de cultivo y un sistema de calefacción indirecta por serpentines o encamisado. Se calienta hasta alcanzar una temperatura de 28 °C, manteniendo esa temperatura y una agitación de 100 a 400 rpm (revoluciones por minuto), considerándose muy adecuada 200 rpm. En forma opcional puede utilizarse un sistema de aireación u oxigenación, mediante sistemas industriales de inyección por tubería sumergida en el medio.

20 2. Se introduce en el fermentador el inóculo contenido en el microorganismo *Streptomyces mobaraensis*, en una proporción de 1% de inóculo en relación al volumen total del medio de cultivo en el fermentador. La inoculación se realiza a través de un conducto estéril.

25 3. Se mantienen las condiciones de temperatura (28 °C) y agitación (200 rpm) durante 72 h. Durante este tiempo el microorganismo crece y produce la enzima echándola fuera de las células al medio de cultivo.

4. Terminada la fermentación a las 72 h, se separan los microorganismos por centrifugación del líquido que contiene las moléculas de enzima producida. Las condiciones de centrifugación pueden variar de 2500 a 7500 g de FCR (Fuerza Centrífuga Relativa) durante un tiempo de 5 a 20 min.

30 5. Despues de centrifugar, el líquido contenido la enzima se liofiliza para separar el agua y obtener un producto sólido en forma de polvo. Este liofilizado en polvo está compuesto por la enzima transglutaminasa como componente activo, y los restos de nutrientes del medio de cultivo: leche, patata y glicerol residual. La lactosa que tiene la leche facilita el proceso de liofilización actuando como lioprotector.

35 Este aditivo alimentario contiene entre 100 y 150 unidades de actividad transglutaminásica por gramo de producto. Las aplicaciones de este producto son como aditivo ligante de alimentos proteicos, tales como productos cárnicos, productos pesqueros o mariscos, productos lácteos y derivados vegetales con alto contenido proteico como elaborados de soja.

REIVINDICACIONES

1. Aditivo alimentario en forma de liofilizado en polvo que comprende enzima transglutaminasa, leche, patata y glicerol.
2. Aditivo alimentario según la reivindicación 1, donde la enzima transglutaminasa es independiente de los iones Ca^{+2} .
- 5 3. Procedimiento de obtención del aditivo alimentario según la reivindicación 1, que comprende a) la producción por fermentación de la enzima transglutaminasa en un medio de cultivo que comprende al menos cepas microbianas de *Streptomyces mobaraensis*, leche, patata, glicerol y agua, b) centrifugación del medio de cultivo y separación de la parte líquida, c) liofilización de la parte líquida.
- 10 4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde la fermentación se lleva a cabo a 28°C y con una agitación de 200 rpm durante 72 horas.
5. Uso del aditivo alimentario, según la reivindicación 1, como ligante de alimentos proteicos.
6. Uso del aditivo alimentario según la reivindicación 5, donde los alimentos proteicos se seleccionan preferentemente entre productos cárnicos, productos pesqueros y mariscos, productos lácteos y derivados vegetales con alto contenido proteico, tales como elaborados de soja.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

②1 N.º solicitud: 201132015

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2011

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12N9/10** (2006.01)
A23L1/30 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES 2338200 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA) 04.05.2010, página 2, línea 55 – página 3, línea 16; página 4, líneas 43-67.	1-6
A	WO 9606931 A1 (NOVO NORDISK) 07.03.1996, página 6, líneas 11-16; página 33, línea 13 – página 36, línea 7; página 44, línea 21 – página 45, línea 35; página 6, líneas 28-31	1-6
A	US 5252469 A (ANDOU et al.) 12.10.1993, columna 1, líneas 7-14; columna 2, líneas 39-45; tablas 2 y 3.	1-6
A	ES 2155480 T3 (NOVOZYMES A/S) 10.07.1996, columna 1, líneas 44-60.	1-6
A	JP 6113793 A (AJINOMOTO KK) 26.04.1994, (resumen) [online] [recuperado29.02.2012] Recuperado de Base de datos EPODOC/EPO.	1-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 29.02.2012	Examinador J. López Nieto	Página 1/4
--	------------------------------	---------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, A23L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.02.2012

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 1-6
Reivindicaciones

SI
NO

Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)

Reivindicaciones 1-6
Reivindicaciones

SI
NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2338200 A1 (UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA)	04.05.2010
D02	WO 9606931 A1 (NOVO NORDISK)	07.03.1996
D03	US 5252469 A (ANDOU et al.)	12.10.1993
D04	ES 2155480 T3 (NOVOZYMES A/S)	10.07.1996
D05	JP 6113793 A (AJINOMOTO KK)	26.04.1994

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención es un aditivo alimentario liofilizado en polvo que comprende transglutaminasa, leche, patata y glicerol (reivindicaciones 1-2) Incluye también el procedimiento de obtención del aditivo mediante fermentación de la transglutaminasa en un medio de cultivo que incluye al menos *Streptomyces mobaraensis*, leche, patata, glicerol y agua(reivindicaciones 3-4) y el uso del aditivo como ligante de alimentos proteicos (reivindicaciones 5-6)

El documento D01 divulga un aditivo alimentario liofilizado en polvo que comprende transglutaminasa, hidrolizado ácido de patata, glicerol, caseinato sódico, extracto de levadura y sales minerales. El documento incluye también el procedimiento de obtención del aditivo mediante fermentación de la transglutaminasa en un medio de cultivo que contiene *Streptomyces mobaraensis* e hidrolizados ácidos de patata, así como el uso de dicho aditivo como ligante de alimentos proteicos (pág.2, lín.55-pág.3, lín.16; pág.4, lín.43-lín.67)

La invención coincide con el aditivo divulgado en D01 en que contiene transglutaminasa y glicerol, sin embargo, el resto de ingredientes es diferente. El procedimiento de obtención del aditivo y de la invención también es distinto dado que las condiciones operativas y los ingredientes del medio de cultivo de *Streptomyces mobaerensis* no son los mismos en un caso y otro.

Los documentos D02 (pág.6, lín.11-16; pág.33, lín.13-pág.36, lín.7; pág.44, lín.21-pág.45, lín.35) y D03 (col.1, lín.7-14; col.2, lín.39-45; tablas 2 y 3) se refieren a la obtención de transglutaminasa a partir de distintos microorganismos, entre ellos cepas de *Streptomyces*, utilizando para ello medios de cultivo variados. En el documento D02(pág.6, lín. 28-31) se indica también el uso de la preparación de transglutaminasa en la elaboración de productos alimenticios (carne, pescado queso lácteos, etc)

Los documentos D04-D06 se refieren al uso de la enzima transglutaminasa en el campo de la alimentación: D04 tiene como objeto una preparación a base de transglutaminasa fosfato de metal alcalino y cloruro sódico que se utiliza para la restructuración de carne cruda (col.1, lín.44-60) D04 indica una composición con transglutaminasa, polifosfato y/o ácido ascórbico y D06 indica todos los tipos de alimentos en los que puede utilizarse transglutaminasa como agente gelificante (punto 7)

Aunque todos los medios de cultivo y el aditivo alimentario reflejados por D02-D06 tienen como base transglutaminasa procedente de *Streptomyces* no incluyen patata ni el resto de componentes del aditivo de la invención.

Así pues, ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan el aditivo alimentario, su procedimiento de obtención y su uso tal y como se definen en las reivindicaciones 1-6. Además no hay sugerencia que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en dichas reivindicaciones. La invención contenida en las reivindicaciones 1-6 cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva en el sentido de los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.