



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 283 011**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 9/76 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **97202591 .0**
⑧6 Fecha de presentación : **22.08.1997**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0899331**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.1999**

⑤4 Título: **Enzima proteolítica purificada y procedimiento de purificación.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

⑦3 Titular/es: **Société des produits NESTLÉ S.A.**
Case Postale 353
1800 Vevey, CH

⑦2 Inventor/es: **Braun, Marcel y**
Neumann, Fred

⑦4 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Enzima proteolítica purificada y procedimiento de purificación.

5 La presente invención, se refiere a una enzima proteolítica purificada y a un procedimiento de purificación de una enzima proteolítica, especialmente, de tripsina.

10 Las proteasas comerciales, de una forma particular, la tripsina comercial, incluso después de la purificación mediante tratamiento especial, por ejemplo, mediante doble cristalización, contiene lipasas residuales, de una forma particular, la fosfolipasa A2, particularmente resistente a la desactivación térmica, la cual se hace seguir a la proteasa, después de su utilización en un procedimiento de hidrólisis.

15 En la fabricación de los hidrolizados de proteína, de una forma particular, los destinados a entrar en la composición de productos infantiles, se utiliza de una forma corriente, la tripsina. Con objeto de incorporar la parte protéica en un producto terminado, por ejemplo, una leche infantil, hace falta suprimir cualquier tipo de actividad enzimática lipolítica residual, procedente del hidrolizado proteico. Esto es necesario con objeto de evitar la aparición de productos de degradación de la lecitina, la cual se añade a la fórmula final, por razones tecnológicas, por ejemplo, con objeto de mejorar la capacidad de humectación de las materias en polvo, en la lisolecitina, de una forma particular, durante el almacenaje. Tales tipos de productos de degradación, pueden manifestarse, tanto en los productos líquidos, como en las materias en polvo, mediante la aparición de defectos de estabilidad u organolépticos, por ejemplo, manchas, malos sabores, o por su toxicidad, la cual conduzca a efectos secundarios, como por ejemplo, de tipo inflamatorio, en los lactantes.

20 Ahora bien, acontece el hecho de que, la eliminación completa de las fosfolipasas, en particular, es difícil de realizar. La purificación completa de las proteasas, requieren generalmente diferentes etapas de precipitación, separaciones cromatográficas, tratamientos térmicos en condiciones bien definidas, o inactivaciones por vía química. La eliminación completa de la fosfolipasa A2, la cual es muy termo-resistente, necesita un tratamiento térmico prologado, lo cual, desgraciadamente, afecta igualmente a la proteasa.

30 El objetivo de la presente invención, es la preparación de una proteasa purificada en donde, la actividad proteolítica, se preserve de una forma cuantitativa y cualitativa, pero que se encuentre exenta de actividad lipolítica, especialmente, la fosfolipasa A2, mediante un procedimiento que sea sencillo y económico.

35 Se conoce un procedimiento de preparación de tripsina purificada, el cual se describe, por ejemplo, en el documento de solicitud de patente estadounidense US - A - 3.886.043, en el cual, se procede a realizar la cromatografía de una solución tampón de tripsina cristalizada, por ejemplo, sobre una resina constituida por gel de dextrano, con grupos sulfónicos injertados, con la finalidad de separar las diferentes formas activas de tripsina porcina.

40 Se conoce, también, el hecho de preparar un cuajo microbiano exento de lipasa, por ejemplo, mediante el procedimiento descrito en el documento de solicitud de patente estadounidense US - A - 4.136.201, mediante cultivo de *Mucor miehei* sobre un medio nutritivo apropiado.

45 La invención, se refiere a una preparación enzimática proteolítica purificada, caracterizada por el hecho de que, ésta, posee una actividad fosfolipasa A2 residual, de como mucho 20 mU/g de enzima pura detectable mediante análisis por cromatografía de alto rendimiento de los fosfolípidos, después de la incubación con una fórmula infantil, en donde, la actividad fosfolipasa A2, no es detectable y que, su actividad proteasa, se mantiene a un valor de un porcentaje de por lo menos un 75% de la actividad inicial de la enzima.

50 Las mediciones de las actividades enzimáticas, se detallan en los ejemplos que se facilitan posteriormente, a continuación. De una forma particular, se entiende por "no deseable", una actividad fosfolipasa A2 residual > 6 mU/g de enzima.

55 La enzima, puede ser toda proteasa de origen vegetal, microbiano o animal, o de origen biogenético. Ésta es, de una forma preferible, una proteasa de origen animal, tal como la pancreatina, de una forma particular, la tripsina de origen porcino.

El procedimiento en concordancia con la presente invención, se caracteriza por el hecho de que:

60 1) Se procede a ajustar el pH de una solución de la proteasa, a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 6 y 9, y se mantiene la solución, a este valor de pH, y a una temperatura de 20-35°C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 15 minutos y de como máximo 120 minutos, de tal forma que se utilice la actividad proteolítica de la proteasa, para destruir la actividad lipolítica de las lipasas y de las fosfolipasas del medio reactivo, y

65 2) Se procede a bajar el pH de la solución, a un valor inferior o igual a 3,5, pudiendo invertirse el orden de las etapas 1) y 2) precedentes.

En una forma preferida de realización, la cual permite suprimir igualmente las trazas de lipasas residuales distintas a la fosfolipasa A2, el procedimiento, comporta una etapa final de tratamiento térmico, de una forma preferente, mediante UHT. Así, de este modo, se eliminan las trazas de lipasas termosensibles.

5 De una forma preferible, el ajuste del valor pH, hacia la zona o valor alcalino, tiene lugar antes de la bajada del valor pH en la zona ácida, en la medida en que se pueda, también, diferir la utilización de la proteasa. En la variable en donde, las dos etapas, se invierten, hace falta utilizar la proteasa, inmediatamente después del tratamiento.

10 En una forma de realización preferida, se procede a añadir una sal de magnesio al medio reactivo, soluble en éste, de una forma preferible, en el inicio de la reacción, lo cual permite estabilizar las proteasas, al mismo tiempo que se favorece la degradación de las fosfolipasas. De una forma preferible, se procede a añadir cloruro de magnesio, a razón de 10 a 200 mM/l de medio reactivo, por ejemplo, de 50 a 100 mM/l de medio reactivo.

15 La concentración de proteasa pura, en la solución, antes del tratamiento, puede ser la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 0,5 y un 6%, en peso, y de una forma preferible, de aproximadamente un 2,5%, en peso.

20 La invención, se refiere igualmente a un procedimiento de preparación de un alimento infantil a base de hidrolizado de proteína, caracterizado por el hecho de que se procede a hidrolizar enzimáticamente un producto lactosérico, por mediación de una proteasa purificada precedente, se trata el hidrolizado, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a una temperatura de 75-85°C/3-5 minutos, se añade materia grasa líquida y minerales, se efectúa un tratamiento de UHF, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a una temperatura de 125-135°C/2-3 minutos, a continuación, se añaden hidratos de carbono, vitaminas y oligoelementos, se esteriliza mediante UHT y se acondiciona asépticamente el producto líquido.

25 Según una variante de este procedimiento, se procede a secar el líquido, especialmente, mediante pulverización, después del tratamiento de esterilización por UHT.

30 La enzima purificada según la presente invención, puede utilizarse, además del sector alimentario, en las aplicaciones de las proteasas, por ejemplo, en la preparación de una composición nutritiva, cosmética o farmacéutica.

35 Se pueden citar, a dicho efecto, las aplicaciones anti-inflamatorias, el tratamiento de los trastornos de la digestión, el tratamiento de la trombosis, el curado de las heridas y de las llagas, y la eliminación de los tejidos necrotizados, por ejemplo.

Los ejemplos que se facilitan a continuación, ilustran la invención. En éstos, las partes y los porcentajes, se refieren a peso, salvo indicación contraria.

40 Ejemplo 1

Se procede a colocar una solución de 1 kg de tripsina porcina 6,0 S, comercial (Novo, Dinamarca), en 10 kg de agua desmineralizada, a una temperatura de 25°C, bajo régimen de agitación, en un recipiente, siendo, la concentración en proteasa, de un porcentaje del 9,1% y siendo, el pH inicial, de un valor de 5. Con el fin de asegurarse de que no se transporta la proteasa no disuelta en la etapa siguiente, se procede a transferir la solución al interior de un nuevo 45 recipiente.

Se añade una solución acuosa diluida de NaOH a 1 M/l, para ajustar el valor pH de la solución a 8. Se procede, a continuación, a mantener el pH a un valor constante, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, mediante la adición, según necesidades, de la solución de NaOH precedente, por ejemplo, por mediación de un pH-ímetro, bajo 50 régimen de agitación, con el fin de hidrolizar las fosfolipasas.

Después de este tratamiento, se procede a estabilizar las proteasas, es decir, la tripsina y la quimotripsina, bajando el pH del medio reactivo, a un valor de 3, mediante la adición de una solución acuosa de HCl a 1 M/l. Se puede utilizar la solución de las proteasas, inmediatamente, en una reacción de hidrólisis, o almacenarla, por ejemplo, a una 55 temperatura de -25°C, en vistas a una utilización diferida.

Los análisis que se facilitan posteriormente, a continuación, muestran la actividad enzimática de la enzima proteolítica purificada, obtenida según la invención, en comparación con la de la enzima cristalizada del comercio (tripsina PTN 6,0 S, Novo, Dinamarca) de partida, que no ha seguido el tratamiento según la invención:

60 1. Determinación de las fosfolipasas

1.1 Determinación de la fosfolipasa A2 mediante el procedimiento radioisotópico

65 El procedimiento, se basa en la segmentación de la fosfatidil-colina (C14-dioleílo), mediante la fosfolipasa A2, y la detección radiométrica puntual de las fracciones marcadas después de la separación cromatográfica.

ES 2 283 011 T3

1.2 Determinación de las fosfolipasas totales mediante titrimetría

El procedimiento, no es específico de la fosfolipasa, y detecta todas las fosfolipasas. Éste se basa en la titrimetría de los ácidos grasos liberados a partir de los fosfolípidos de yema de huevo (Fluka, Buchs, Suiza), mediante las fosfolipasas de pH 8 (mantenido mediante un pH-ímetro), a la temperatura constante de 40°C, con 1,4 mM de desoxicolato sódico y 3 mM CaCl₂. Se utilizan 2 g de fosfolípido de yema de huevo, purificada mediante la adición de 250 mg de inhibidor de tripsina de yema de huevo de pavo (Sigma, St. Louis, USA), por 1 g de tripsina.

2. Determinación de lipasa y estearato

2.1 Se procede a determinar la actividad de las lipasas por titrimetría, utilizando aceite de oliva como sustrato, a razón de 100 g/l, a un pH constante de un valor de 8,9 (pH-ímetro), en presencia de 1,25 g/l de taurocolato y de 82,5 g/l de goma arábica.

2.2 Se procede a determinar la actividad de las esterases, utilizando el procedimiento precedente (2.1) pero tomando los triglicéridos de cadena media (MCT) como sustrato.

3. Determinación de las proteasas

3.1 Para la tripsina, se utiliza el procedimiento descrito por parte de Erlanger y colegas, en Arch. Biochem. Biophys. 95, 271-278.

3.2 Para la quimotripsina, se utiliza el procedimiento de la farmacoteca estadounidense US Pharmacopeia XXI (1985).

Los resultados de los análisis de las actividades, en la preparación de la enzima, se indican en la tabla 1 que se facilita abajo, a continuación.

TABLA 1

Preparación de la enzima	Fosfolipasa A2 (U/g), 1.1	Fosfolipasas (U/g),	Lipasas (U/g)	Esterasa (U/g)	Tripsina (g/kg)	Quimo-Tripsina (USP/mg)
Tripsina PTN 6, 0S purificada según la invención	< 0,0022	0,79	0,21	0,22	323	41
Tripsina PTN 6,0 S de partida	87	14	0,34	0,39	213	42

ES 2 283 011 T3

Se constata el hecho de que, el tratamiento, permite disminuir considerablemente la actividad de enzimas distintas de la proteasa, de una forma particular, suprimir la de la fosfolipasa A2, manteniendo al mismo tiempo la actividad proteolítica, en calidad y en cantidad, de una forma particular, el equilibrio entre la tripsina (93% de actividad, con relación a la enzima no tratada) y la quimotripsina (86% de actividad, con relación a la enzima no tratada).

Ejemplo 2

Se procede a poner en solución 1 kg de tripsina porcina 6,0 S procedente del comercio (Novo, Dinamarca) en 10 kg de agua desmineralizada, a una temperatura de 25°C, bajo régimen de agitación, en un recipiente, siendo, la concentración en proteasa, de un 9,1%, y siendo, el pH inicial, de un valor de 5. Con la finalidad de asegurarse del hecho de que no se transporte proteasa no disuelta, en la etapa siguiente, se procede a transferir la solución, al interior de un nuevo recipiente.

Se procede, a continuación, a añadir 224 g de cloruro magnésico ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), se ajusta el pH a un valor de 8,5, en un transcurso de tiempo de 15 minutos, con una solución acuosa diluida de NaOH a 1 M/l. Se deja reaccionar el medio, durante un transcurso de tiempo de 120 minutos, a una temperatura de 25°C, sin controlar el pH, con el fin de hidrolizar las fosfolipasas.

Después de este tratamiento, se procede a estabilizar las proteasas, es decir, la tripsina y la quimotripsina, disminuyendo el pH del medio reactivo a un valor de 3, mediante la adición de una solución acuosa de HCl, a 1 M/l, y se deja la solución en reposo, durante un transcurso de tiempo de 16 horas, a una temperatura de 4°C. La solución de tripsina purificada, se encuentra entonces lista para ser utilizada.

Se constata el hecho de que, la actividad relativa de la tripsina, es de un 93% de la de partida y que, la actividad relativa de la quimotripsina, es de un 86%, con respecto a la de partida.

Ejemplo 3

Se procede a utilizar la preparación enzimática purificada del ejemplo 2, para preparar una fórmula infantil hipoalérgica. Se realiza la hidrólisis de las proteínas de lactosuero y, a continuación, se trata el hidrolizado, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a 75-85°C/3-5 minutos, se procede a añadir materia grasa y minerales, se efectúa un tratamiento de UHT, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a una temperatura de 125°C/2 minutos, a continuación, se añade la maltodextrina y vitaminas, se esteriliza mediante UHT, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a 148°C/5 segundos, y se acondiciona asépticamente el producto líquido.

Con objeto de someter a test de ensayo la actividad enzimática residual, se procede a añadir 10 ml de solución de tripsina purificada, según el ejemplo 1, a 100 ml de fórmula infantil líquida precedente, en donde, la actividad de la fosfolipasa A2, es < 6 mU/g de tripsina. Después de haber procedido a la mezcla, se reducen las actividades de la lipasa y la esterasa, mediante un tratamiento térmico ambiente, se añaden 55 mg de aziduro de sodio, y se procede a incubar la solución, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a 40°C/4 días. Después de la incubación, se analiza la composición de los fosfolípidos, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y se calcula la actividad de la fosfolipasa A2, expresada en mU/100 g de producto mU PL-A2), a partir de las diferencias de concentración de los lisofosfolípidos, según la fórmula:

$$\text{mU PL-A2} = \frac{(\text{LPC} + \text{LPE}) \text{ al tiempo } t_2 \text{ menos } (\text{LPC} + \text{LPE}) \text{ al tiempo } t_1 \text{ en mg/100 g de producto}}{540 (\text{masa molecular de las lisolecitinas de huevo} \times (t_1 - t_2))}$$

siendo, LPC = lisofosfatidil-colina y LPE = lisofosfatidil-etanolamina, así como, este valor, tomado como referencia con respecto a la concentración de tripsina pura, en g/100 g, es decir, mU PL-A2/g de tripsina pura.

Se evalúa, igualmente, la degradación de la tripsina y de la quimotripsina, en %, con relación a la actividad inicial, así como la degradación de los fosfolípidos, después de un transcurso de tiempo de 9 meses de almacenaje, a una temperatura de 20°C, en % de los fosfolípidos de partida.

ES 2 283 011 T3

Los resultados obtenidos, se indican en la tabla que se facilita abajo, a continuación:

TABLA 2

	PL-A2 (mU/g) de tripsina pura), HPLC	Tripsina (% del inicial	Quimo- tripsina (% del inicial)	Degradación De los fosfolípidos (% de los iniciales)
Hidrolizada mediante la tripsina PTN 6, 0S purificada según la invención	16	94	75	<1
Hidrolizada mediante la tripsina PTN 6,0 S de partida	349000	100	100	100

50 Ejemplo 4

Se prepara un producto infantil como en el ejemplo 3, excepto en cuanto a lo referente al hecho de que, en este caso, se procede a añadir un fosfolípido a la mezcla líquida, antes de secarla por pulverización. Se constata el hecho de que, la actividad de las fosfolipasas, se encuentra fuertemente unida a la degradación de los fosfolípidos del producto. Grandes volúmenes de cargas, una producción interrumpida, asociadas a una actividad elevada de las fosfolipasas, degrada a los fosfolípidos, hasta un cierto grado, antes que el producto se seque. Los productos que contienen la tripsina purificada según la presente invención, muestran una degradación claramente mínima de las fosfolipasas añadidas, según la cantidad total de los fosfolípidos añadidos a la fórmula, > 1%, mientras que, ésta, representa un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van de un 20 aun 90%, cuando se utiliza la misma tripsina que no ha seguido el tratamiento de purificación según la invención.

Adicionalmente, además, el análisis de las proteínas residuales, mediante SDS - PAGE, y el análisis de los antígenos inmunológicamente activos, mediante ELISA, no mostraron diferencias significativas en cuanto a lo referente a la utilización de tripsina purificada según la invención, con respecto a una producción con la utilización de tripsina no purificada.

REIVINDICACIONES

1. Preparación enzimática proteolítica purificada, **caracterizada** por el hecho de que, ésta, posee una actividad fosfolipasa A2 residual, de como mucho 20 mU/g de enzima pura detectable mediante análisis por cromatografía de alto rendimiento de los fosfolípidos, después de la incubación con una fórmula infantil, en donde, la actividad fosfolipasa A2, no es detectable y que, su actividad proteasa, se mantiene a un valor de un porcentaje de por lo menos un 75% de la actividad inicial de la enzima.

2. Preparación enzimática, según la reivindicación 1, **caracterizada** por el hecho de que, la enzima, es la tripsina porcina.

3. Procedimiento de purificación de enzima proteolítica, especialmente, la tripsina, **caracterizado** por el hecho de que:

1) Se procede a ajustar el pH de una solución de la proteasa, a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 6 y 9, y se mantiene la solución, a este valor de pH, y a una temperatura de 20-35°C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 15 minutos y de como máximo 120 minutos, de tal forma que se utilice la actividad proteolítica de la proteasa, para destruir la actividad lipolítica de las lipasas y de las fosfolipasas del medio reactivo, y

2) Se procede a bajar el pH de la solución, a un valor inferior o igual a 3,5, pudiendo invertirse el orden de las etapas 1) y 2) precedentes.

4. Procedimiento, según la reivindicación 3, **caracterizado** por el hecho de que, éste, comporta una etapa final de tratamiento térmico, de una forma preferente, mediante UHT, que permite suprimir igualmente las trazas de las lipasas residuales distintas de la fosfolipasa A2.

5. Procedimiento, según la reivindicación 3, **caracterizado** por el hecho de que, el ajuste del pH, entre unos valores de 6 y 9, tiene lugar antes de la reducción del pH a un valor inferior o igual a 3,5.

6. Procedimiento, según la reivindicación 3, **caracterizado** por el hecho de que, al medio reactivo, se le añade una sal de magnesio, soluble en éste, de una forma preferente, en el inicio de la reacción, lo cual permite estabilizar las proteasas, al mismo tiempo que se favorece la degradación de las fosfolipasas.

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, **caracterizado** por el hecho de que, al medio reactivo, se le añade cloruro de magnesio, a razón de unas cantidades comprendidas dentro de unos márgenes que van de 10 a 200 mM/l y, de una forma preferente, a razón de unas cantidades que van de 50 a 100 mM/l de medio reactivo.

8. Procedimiento, según la reivindicación 3, **caracterizado** por el hecho de que, la concentración de proteasa pura en la solución, antes del tratamiento, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 0,5 y un 6%, en peso, y ésta es, de una forma especial, del 2,5% en peso.

9. Procedimiento de preparación de un alimento infantil a base de hidrolizado de proteína, **caracterizado** por el hecho de que se procede a hidrolizar enzimáticamente un producto lactosérico, por mediación de una proteasa purificada según la reivindicación 1, por el hecho de que se trata el hidrolizado, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a una temperatura de 75-85°C/3-5 minutos, por el hecho de que se añade materia grasa líquida y minerales, por el hecho de que se efectúa un tratamiento de UHF, en unas condiciones de temperatura y transcurso de tiempo, correspondientes a una temperatura de 125-135°C/2-3 minutos, y por el hecho de que, a continuación, se añaden hidratos de carbono, vitaminas y oligoelementos, por el hecho de que se esteriliza mediante UHT y por el hecho de que se acondiciona asépticamente el producto líquido.

10. Procedimiento, según la reivindicación 9, **caracterizado** por el hecho de que, después del tratamiento de esterilización mediante UHT, se procede a secar el líquido, especialmente, mediante pulverización

11. Utilización de una preparación enzimática purificada, según la reivindicación 1, en la preparación de una composición nutritiva, cosmética o farmacéutica.