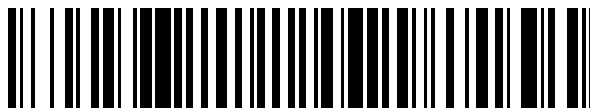


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 902 196**

21 Número de solicitud: 202030966

51 Int. Cl.:

A23J 3/04 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.09.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.03.2022

71 Solicitantes:

VISCOFAN, S.A. (100.0%)

**C/ Berroa nº 15 4ª pl. Polígono Industrial Berroa
31192 TAJONAR (Navarra) ES**

72 Inventor/es:

GONZÁLEZ SALAZAR, Itxaso;

SORET MARTÓN, Agustín;

LONGO ARESO, Carlos María;

RECALDE IRURZUN, José Ignacio y

IZCO ZARATIEGUI, Jesús María

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

54 Título: **Polvo seco de colágeno con propiedades saciantes y método para su preparación**

57 Resumen:

Polvo seco de colágeno con propiedades saciantes y método para su preparación

La invención se refiere a un polvo seco de colágeno con actividad saciante que puede ser usado como aditivo alimentario o incorporado a un producto alimentario para aumentar el poder saciante del mismo. La invención también está dirigida al método de preparación del polvo saciante, así como a su aplicación en tratamientos dietéticos y/o médicos en humanos o animales para aumentar la saciedad y reducir la sensación de hambre y, de esta manera reducir la ingesta de alimentos. El polvo seco de colágeno de la invención es por tanto de utilidad para combatir la obesidad.

ES 2 902 196 A1

DESCRIPCIÓN

Polvo seco de colágeno con propiedades saciantes y método para su preparación

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención pertenece al campo dietético de los productos saciantes. Más particularmente, la invención se refiere a un polvo seco de colágeno con actividad saciante que puede ser usado como aditivo alimentario o incorporado a un producto alimentario para aumentar el poder saciante del mismo. La invención también está dirigida al método de preparación del polvo saciante, así como a su aplicación en tratamientos dietéticos y/o médicos en humanos o animales para aumentar la saciedad y reducir la sensación de hambre y, de esta manera reducir la ingesta de alimentos. El polvo seco de colágeno de la invención es, por tanto, de utilidad para combatir la obesidad.

15 La invención también está relacionada con cualquier uso como agente saciante o como complemento alimentario o como ingrediente en productos sustitutivos, alimento de uso médico o *novel food* que comprende dicho polvo de colágeno para la reducción de peso, así como con un producto alimentario que comprende el polvo de colágeno anteriormente mencionado.

20

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La obesidad y los trastornos asociados a ésta son un problema de salud pública a nivel mundial. En este sentido, se han desarrollado diferentes estrategias para combatirla entre las cuales se encuentran la de aumentar el metabolismo, inhibir la digestión y/o reducir la ingesta de calorías.

25

Dentro de la estrategia de reducir la ingesta de calorías se enmarca el uso de productos o aditivos saciantes cuya finalidad es reducir el apetito y de este modo minimizar la ingesta de alimentos. El efecto saciante se produce de manera natural con la ingesta de alimentos y perdura en tanto en cuanto no se vacíe el estómago. Por ello, los productos que persistan más tiempo en el estómago y que sean digeridos de una manera más lenta tendrán un efecto saciante más largo. También el efecto “swelling” o hinchamiento favorece el efecto saciante al aumentar la presión sobre las paredes del aparato digestivo.

30

Se han desarrollado productos con efecto saciante en base a diferentes compuestos o sustancias y también en base a diferentes principios.

5 Una aproximación para conseguir el efecto saciante es aumentando la presión sobre las paredes del estómago. Así, DE10161986 describe una composición para administración oral en base a un sólido, líquido o gas que en las condiciones del estómago libera gas aumentando la presión en las paredes del estómago y produciendo el efecto saciante. Este efecto saciante, es sin embargo, poco duradero y por tanto poco efectivo.

10 Otra estrategia se ha basado en el uso de polímeros y/o polisacáridos con capacidad de hinchamiento para proporcionar el efecto saciante.

Por ejemplo, WO2009049105 describe un método para inducir saciedad mediante el uso de polímeros que aumentan el volumen del bolo alimenticio sin aumentar la densidad energética
15 del mismo.

Por su parte, WO2004056375 se refiere a un agente para producir efecto saciante y para reducir el nivel de colesterol que contiene polisacáridos poco esterificados y al menos un polisacárido capaz de hincharse y aumentar su volumen.

20 De manera similar, WO2004056393 describe un agente con efecto saciante basado en polisacáridos que contienen ácido poliurónico capaces de hincharse en el estómago.

Otras estrategias van dirigidas a hacer los componentes de los productos saciantes más
25 resistentes a la hidrólisis ácida en el estómago para que ejerzan su efecto saciante en el duodeno. Por ejemplo, EP 2651426 describe un producto a base de proteína de guisante y/o trigo incorporada en un vehículo gastrorresistente de modo que dichas proteínas lleguen sin hidrolizar al duodeno y ejerzan ahí su función saciante.

30 También se han utilizado el colágeno o los derivados de este también para desarrollar productos o composiciones con efecto saciante y como medio para combatir la obesidad.

Así, KR100417020 describe una composición con efecto saciante a base de agar, gel de alginato y gelatina proveniente de la hidrólisis de colágeno.

35

EP0901792 describe un vehículo comprimido y no tóxico que una vez en el estómago se expande y tiene forma de esponja, produciendo así el efecto saciante. Este vehículo proviene de organismos marinos como esponjas y tiene parcialmente estructura de colágeno.

- 5 El documento CN106509126 describe una bebida para la pérdida de peso y el adelgazamiento en forma de polvo reconstituible en agua que comprende una mezcla compleja de múltiples componentes y nutrientes. Uno de estos componentes es el colágeno en polvo.

- 10 El documento EP2575496 describe un polvo de colágeno con propiedades saciantes. El polvo de colágeno descrito en este documento se caracteriza por estar parcialmente desnaturalizado, perdiendo su estado nativo y conteniendo un alto porcentaje de gelatina.

- 15 Los autores de la presente invención han desarrollado un polvo de colágeno con propiedades saciantes que puede ser usado como aditivo alimentario o dietético cuya característica principal es que es que presenta una capacidad de hinchamiento mayor a la de productos comerciales existentes en condiciones de pH similares a las del estómago en la digestión, así como una mayor resistencia a la digestión enzimática, lo cual permite alargar el efecto saciante durante periodos más largos.

- 20 El polvo de colágeno de la presente invención no ha sido sometido a ningún tipo de proceso de desnaturalización, por tanto, presenta un nivel de gelatina nulo o extremadamente bajo. De hecho, el polvo de colágeno de la presente invención presenta una estructura muy próxima al la del colágeno nativo.

OBJETO DE LA INVENCION

- 25 El objeto principal de la invención es un polvo seco de colágeno con propiedades saciantes caracterizado porque:

- 30 a) más de un 70% de colágeno es nativo;
b) tiene un contenido en gelatina inferior al 4% en peso;
c) al menos el 95% del polvo presenta una granulometría de entre 10 µm y 5 mm.

A partir de ahora nos referiremos indistintamente a este polvo seco de colágeno como polvo o producto de la invención.

35

Otro objeto de la presente invención es un ingrediente o complemento alimentario o dietético que comprende el polvo de la invención. A partir de ahora nos referiremos indistintamente a este ingrediente o complemento alimentario o dietético como ingrediente o complemento de la invención.

5

Además, es también objeto de la invención un producto alimentario que incorpore, contenga o comprenda en su composición el polvo de la invención o el ingrediente o complemento de la invención.

10 Es asimismo objeto de la presente invención un método para obtener el polvo de la invención. Nos referiremos a este como el método de la invención.

Un último objeto de la invención viene representado por el uso del polvo de la invención, del ingrediente de la invención o del producto alimentario de la invención como producto saciante en seres humanos o animales, así como en el tratamiento y/o prevención de la obesidad.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: resultados del análisis DSC de una muestra de polvo de colágeno de la invención (2A), de una muestra de Collapro® (2B), de una muestra de Kapro® (2C) y de una muestra de una gelatina comercial. La muestra de polvo de colágeno de la invención (2A) contiene un pico endotérmico característico del colágeno nativo, mientras que las otras muestras no lo tienen por lo que no se trata de colágeno nativo (2B, 2C y 2D).

20

25 **Figura 2:** RINDS después del tratamiento químico.

Figura 3: Capturas de microscopio a distintas diluciones con detalle de las distintas jerarquías de fibras que la observación por microscopía permite resolver.

30 **Figura 4:** imágenes de los geles obtenidos en el ensayo Bloom para las muestras de polvos de la invención (P1 y P2), para Kapro C®, para Kapro SF® así como para una muestra de gelatina

Figura 5: imagen del sobrenadante que aparece en la gelificación de una de las muestras del polvo de colágeno de la invención.

35

Figura 6: Peso promedio en gramos de los animales durante el tratamiento con los distintos grupos experimentales durante el tratamiento. Los datos están representados como media del grupo $\pm$ SEM.

5 **Figura 7:** Diferencia de peso entre el final y el inicio del tratamiento promedio en gramos. Interaction test ANOVA 2x2 $p < 0.005$; t-Student $*p < 0.0001$ HFSPF CAS vs HFSPFCOL, $*p < 0.0001$ PF CAS vs PF COL. Los datos están representados como media del grupo $\pm$ SEM.

10 **Figura 8:** Ingesta promedio de los diferentes grupos experimentales expresada en g (A) y % respecto al grupo Control (B). Efecto de la interacción entre el protocolo y el tipo de proteína suplementada sobre la ingesta (C). $## p < 0.01$ vs HFS; $### p < 0.001$ vs HFS; $\$ p < 0.05$ vs Casein 2h. Nota: no se ha considerado el Grupo 1 (Control) en el análisis estadístico, utilizándose el Grupo 2 (Control HFS) como grupo de referencia para los ANOVA de 1 vía.

15 **Figura 9:** comparativa de los niveles séricos de ghrelina para el grupo Collagen 2h frente a Casein 2h. El grupo tratado con colágeno produce una disminución significativa de los niveles de ghrelina a las 2 horas en comparación con el grupo tratado con caseína.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Con el fin de facilitar la comprensión y de aclarar el significado de determinados términos en el contexto de la presente invención se aportan las siguientes definiciones:

“**Polvo seco**”: Se trata del polvo de la invención obtenido tras un proceso de secado para eliminar gran cantidad de agua, hasta alcanzar un grado de humedad de entre el 1% y el 18%.

25 “**Colágeno**”: es una proteína cuya molécula unitaria básica llamada tropocolágeno está formado por tres cadenas de aminoácidos entrelazadas y unidas entre sí por puentes de hidrógeno. Las unidades de tropocolágeno se van agrupando en distintos órdenes dando lugar a fibras que a su vez se agrupan en haces de fibras y finalmente en grandes haces de fibras.

30 “**Propiedades saciantes**”: se refiere a la capacidad del polvo de la invención de satisfacer la necesidad de alimentos o bebida durante un determinado periodo de tiempo.

35 “**Gelatina**”: Es el producto que se obtiene tras desnaturalización del colágeno, habitualmente mediante aplicación de altas temperaturas durante un determinado tiempo.

“Colágeno nativo”: se refiere a la propiedad de un determinado colágeno de mantener su estado nativo, esto es, de mantener la estructura que presenta de manera natural en la fuente de colágeno de la que proceda, de manera preferente la dermis. Se puede decir que el estado nativo del colágeno o el colágeno nativo es lo contrario al colágeno desnaturalizado.

5 **“Grados Bloom”**: es una medida que sirve para caracterizar el poder gelificante de un producto. Es la fuerza que necesita un cilindro en penetrar en un gel de colágeno al 6,67% en agua hasta alcanzar una profundidad de 4mm. Es una medida estándar de la fuerza aplicada para causar una deformación a una concentración y temperatura estandarizadas en un gel. Se utiliza habitualmente para caracterizar gelatinas, las cuales se comercializan según su
10 capacidad para gelificarse. Existe una correlación entre el grado Bloom y la concentración de la gelatina. Cuanto mayor es la cantidad de gelatina en un producto, mayor es la capacidad gelificante y mayor es su valor en Grados Bloom.

“Fracción de colágeno no digerido”: se refiere a la fracción remanente de colágeno que no
15 ha sido digerida por la pepsina en unas condiciones determinadas, particularmente, en el contexto de la presente invención, las del ensayo de digestión de polvos de pepsina.

“Ensayo de digestión de polvos con pepsina”: se refiere a un test analítico que permite determinar el grado de resistencia de un determinado colágeno a la digestión en condiciones
20 ácidas con la enzima pepsina, una proteasa (endopeptidasa) que actúa sobre el enlace peptídico rompiéndolo, y liberando así el grupo amino y el grupo carboxilo. Este ensayo es una simulación de digestión durante 40 min, a temperatura controlada con enzima pepsina y ácido clorhídrico que pretende mimetizar las condiciones del estómago.

25 **“Porcentaje de hinchamiento”**: es una medida que permite evaluar el incremento de peso del colágeno cuando es sometido al ensayo de hinchamiento o swelling. El ensayo swelling ácido de polvos consiste en introducir el polvo de colágeno 2 horas en condiciones ácidas. Tras 2 horas se realiza un centrifugado, por el cual las fibras hinchadas de colágeno precipitan y se pesan. Por diferencia de pesadas se calcula el swelling o hinchamiento en porcentaje.

30 **“Complemento o Ingrediente alimentario o dietético”**: en el contexto de la presente invención se refiere a cualquier componente alimentario que incorpore el polvo de colágeno de la invención y que se utilice en la fabricación o la elaboración de un alimento y siga estando presente en el producto acabado, aunque sea en una forma modificada.

35

“Producto alimentario”: en el contexto de la presente invención se refiere a todo alimento que mediante procesos industriales químicos y/o físicos de tratamiento, manipulación, conservación y envasado es apto para el consumo humano y puede ser vendido al público y contiene en su composición el polvo de colágeno de la invención o el complemento o ingrediente de la invención.

“Tratamiento mecánico”: En el contexto de la presente invención se aplica al conjunto de procesos destinados a extraer y disminuir el tamaño y longitud de las fibras de colágeno de las fuentes de colágeno utilizadas. Los tratamientos mecánicos implican procesos de tipo picado o molienda que se realizan de manera controlada y siempre con control de temperatura para evitar la desnaturalización del colágeno.

“Fuente de colágeno”: se refiere a la materia prima utilizada para la extracción y tratamiento posterior del colágeno para dar lugar al polvo de la invención. En una realización preferida, la fuente de colágeno es de origen bovino, ovino, porcino, aviar, de pescado o mezcla de los mismos. De una manera aún más preferida la fuente de colágeno son pieles de origen bovino de animales de una edad entre 0 y 3 años, preferiblemente inferior a 2,5 años.

El polvo de colágeno

El aspecto principal de la invención se refiere a un polvo seco de colágeno con propiedades saciantes caracterizado porque comprende colágeno con un elevado porcentaje de colágeno nativo y muy escasa o ausencia de gelatina.

De manera más concreta la invención se refiere a un polvo seco de colágeno con propiedades saciantes caracterizado porque:

- a) más de un 70% del colágeno es nativo;
- b) tiene un contenido en gelatina inferior al 4% en peso;
- c) al menos el 95% del polvo presenta una granulometría de entre 10 μ m y 5 mm.

De manera preferente, el polvo seco de colágeno está constituido por colágeno nativo en más del 75%, más preferiblemente en más del 80% y aún más preferiblemente en más del 90%.

También de manera preferente, el polvo seco de colágeno tiene un contenido de gelatina inferior al 2,5% en peso, preferiblemente inferior al 1% en peso, y aún más preferiblemente por ausencia de gelatina.

5 La gelatina se puede aislar en un polvo seco a partir de la fracción soluble en sulfato amónico al 10% de concentración y su posterior centrifugación a 18.000rpm. Mediante el método Biuret se puede posteriormente determinar el contenido de proteína de dicha fracción y se expresa en porcentaje. Esta fracción aparece cuando el colágeno está degradado. La precipitación del colágeno nativo empleando sales, dejando como la fracción soluble el colágeno degradado,
10 incluyendo la gelatina, ya fue descrito por Piez en 1967 (Soluble collagen and the components resulting from its denaturation, en: Treatise on Collagen (G.N.Ramachandran, ed) Vol. 1, P.207. Academic Press, New York. Hemos comprobado que cuando se añade gelatina a una muestra de colágeno, este método permite cuantificarla con exactitud.

15 El bajo porcentaje de esta fracción o la ausencia de ésta, está directamente relacionada con el hecho de que el colágeno sea nativo, es decir, cuando el colágeno no ha sido sometido a tratamiento alguno de desnaturalización o hidrólisis y no se encuentra degradado. De ahí también, se deriva el hecho de que el porcentaje de gelatina sea tan bajo en el polvo de la invención.

20 Una manera de medir el grado de desnaturalización del polvo de colágeno de la presente invención fácilmente es mediante análisis DSC. Mientras, que el polvo de la presente invención presenta un perfil DSC de colágeno nativo sin detectar nada de colágeno desnaturalizado y caracterizado por un marcado pico endotérmico alrededor a los 109,67°C
25 (ver Figura 1A) y con una entalpía de desnaturalización de 46,65 J/g (humedad de la muestra 15.5%), los polvos de colágeno de otros productos comerciales anteriores tales como Collapro® (ver figuras 1B) y Kapro® (ver Figura 1C) muestran un perfil DSC sin ningún pico endotérmico característico del colágeno nativo. Sus perfiles presentan picos alrededor de los 82°C, coincidiendo con uno de los dos picos de la gelatina, 82°C y 53°C (Ver Figura 1D). Se
30 tratan por tanto de polvos con mucho colágeno desnaturalizado (gelatina) y colágeno nativo escaso o indetectable.

Por tanto, el polvo de la presente invención está formado en más de un 70% por colágeno nativo (teniendo en cuenta que una entalpía de desnaturalización de por encima 45 J/g °C es
35 típica de colágeno nativo y considerando para los cálculos que una entalpía de 65 J/g °C para

el colágeno bovino Tipo I representa un colágeno 100% nativo), preferentemente en más del 75%, más preferentemente en más del 80% y aún más preferentemente en más del 90%. Además, el polvo de la invención contiene la fracción soluble en sulfato amónico (% Gelatina), el colágeno más degradado, siempre inferior al 4% en peso, más preferentemente inferior al 2,5% en peso, aun más preferentemente inferior al 1% en peso, y de manera preferente por ausencia de la fracción de gelatina.

En cuanto al tamaño de partícula, el polvo de colágeno de la invención tiene una granulometría donde al menos el 95% de las partículas se encuentran entre 10 μm y 5 mm, más preferentemente al menos el 90% de las partículas se encuentran entre de entre 100 μm y 2 mm. La granulometría media del polvo de la invención se encuentra entre los 250 μm y 1 mm.

Por otro lado, el polvo de colágeno de la invención ha demostrado un comportamiento físico-químico especialmente adecuado para su uso como aditivo con propiedades saciantes en seres humanos o animales.

Por un lado, demuestra una capacidad extraordinaria de hinchamiento o swelling en condiciones de pH similares a las del estómago. Esta capacidad de hinchamiento es al menos un 32% superior a los productos comerciales similares existentes incluido el descrito en EP 2575496. De manera particular, el polvo de la invención posee un porcentaje de hinchamiento en el ensayo de swelling ácido de polvos de colágeno superior al 1500%, preferentemente superior al 1550%. Esta extraordinaria capacidad de hinchamiento va a favorecer la reducción del apetito o efecto saciante una vez que el polvo de la invención alcance el estómago ya que, al aumentar su volumen en el medio de pH ácido del estómago, el bolo alimenticio ejercerá mayor presión en las paredes gástricas aumentando la sensación de saciedad.

Asimismo, el colágeno del polvo de la invención al mantener una conformación que se asemeja en gran medida a la que presenta en estado nativo, con prácticamente ausencia de desnaturalización y gelatina; posee una resistencia a la digestión enzimática mucho mayor. Esto permite que el efecto de saciedad sea mucho más prolongado en el tiempo ya que el aparato digestivo necesitará más tiempo para su degradación total. La resistencia a la digestión de un polvo de colágeno se puede determinar mediante el llamado ensayo de digestión con pepsina. En este ensayo se mide la fracción de colágeno no digerido tras una simulación de digestión durante 40 minutos, a temperatura controlada con enzima pepsina y ácido clorhídrico mimetizando las condiciones del estómago. En este ensayo, el polvo de la

presente invención presenta una fracción de colágeno no digerido tras el ensayo de digestión de polvos con pepsina superior al 30%. En el mejor de los casos los productos comerciales comparables al polvo de la invención no presentan resultados de resistencia a la digestión con pepsina superiores al 15,6%. Es decir, el polvo de la presente invención tiene al menos el doble de resistencia a la digestión que otros productos comerciales con los que se ha comparado.

Asimismo, existe un método para caracterizar el grado de gelificación de un determinado colágeno. El método está establecido en la Norma ISO9665:1998(E) y lo que se mide es la fuerza o grado Bloom que expresa la fuerza que necesita un cilindro en penetrar en un gel de colágeno al 6,67% en agua hasta alcanzar una profundidad de 4mm. Lo destacable en relación al polvo de colágeno de la invención con respecto a este ensayo no es tanto el valor Bloom que alcanza sino que los geles preparados con el polvo de colágeno de la invención para este ensayo presentan un sobrenadante de agua que no se incorpora al gel. Este comportamiento probablemente tiene que ver con el bajo porcentaje de gelatina presente en el polvo de colágeno de la invención, así como a la elevada resistencia del colágeno a gelificarse en las condiciones del ensayo (Ver Ejemplo 5). La gelatina tiene una gran capacidad de incorporar agua pero la ausencia de gelatina o su bajo porcentaje en el polvo de la invención no permite incorporar toda el agua y por ello probablemente aparece el sobrenadante en el test de Bloom. Es preciso recordar que el polvo de la invención tiene una capacidad de hinchamiento superior a otros polvos existentes pero cuando se realiza en medio ácido, a pH similares a los del estómago.

El polvo de la invención se encuentra en forma seca y esto implica que tiene un contenido de humedad de entre 1 y 16%.

El polvo seco de colágeno de la invención tiene una granulometría de entre 10 μm y 5 mm, preferentemente el 80% de las partículas se encuentran entre 250 μm y 2000 μm . Ello favorece, por ejemplo, que el producto tenga un tamaño adecuado para su ingesta, así como para dispersarlo en alguna matriz con la que combinarlo para ser ingerido.

En cuanto al origen del colágeno, este puede provenir de cualquier fuente de colágeno animal. Es preferible que además la fuente de colágeno sea lo más fresca posible, de manera que se utilicen las pieles de animales sacrificados recientemente y no hayan sido salados y almacenados durante largo tiempo. En una realización particular el colágeno es de origen

bovino, ovino, porcino, aviar, de pescado o una mezcla de los mismos. De una manera preferida, el colágeno es de origen bovino y de un animal de una edad entre 0 y 3 años, preferiblemente menor de 2,5 años.

5 Método de preparación del polvo seco de colágeno

Es también objeto de la presente solicitud un método para obtener el polvo de colágeno de la invención que comprende:

- 10 a) Tratamiento mecánico de una fuente de colágeno, previamente acondicionada y acidificada, para la reducción del tamaño de las fibras hasta obtener una masa de colágeno;
- b) Diluciones sucesivas de la masa de colágeno de la etapa a) a temperatura inferior a 25°C para obtener una masa de colágeno concentrada;
- 15 c) Homogenización de la masa a temperatura inferior a 25°C y extrusión de la masa de colágeno de la etapa b);
- d) neutralización de la masa de colágeno de la etapa c) con un agente alcalino hasta un pH de entre 6 a 9;
- e) Secado de la masa de colágeno de la etapa d) hasta una humedad de entre 1% y 18%;
y
- 20 f) Moler la masa seca de la etapa d) hasta obtener un polvo de colágeno.

La primera etapa del método tiene la finalidad de reducir el tamaño de las fibras de colágeno hasta obtener una masa de colágeno viscosa y homogénea que será procesada en etapas sucesivas. Para ello la fuente de colágeno previamente acondicionada y acidificada es tratada
25 mecánicamente. Cualquier medio capaz de reducir mecánicamente el tamaño de las fibras puede usarse en la etapa a) del método, aunque de manera preferente el tratamiento mecánico se lleva a cabo mediante molienda hasta obtener una masa homogénea.

Como paso previo a esta primera etapa del método de la invención, el colágeno debe ser
30 acondicionado y acidificado. El tratamiento de acondicionamiento y acidificación de la fuente de colágeno de la etapa a) comprende:

- i. eliminar químicamente el pelo de la fuente de colágeno si la fuente utilizada los comprende,
- ii. opcionalmente, uno o varios lavados con agente oxidantes,

- iii. opcionalmente, tratamiento alcalino para eliminar la grasa y otras impurezas de la fuente de colágeno; y
- iv. acidificación de la fuente de colágeno a un pH de entre 0.1 y 4.

- 5 Así pues, el acondicionamiento de la fuente de colágeno empieza con el tratamiento de la fuente de colágeno, normalmente pieles bovinas, ovinas o de cerdo que presentan pelo y que debe ser eliminado. Para ello, se lleva a cabo un tratamiento químico generalmente con sales sulfúricas como Na_2S y un tratamiento alcalino con $\text{Ca}(\text{OH})_2$.
- 10 Después para el correcto acondicionamiento se pueden llevar a cabo opcionalmente uno o varios lavados con agentes oxidantes suaves como, por ejemplo, peróxido de hidrógeno diluido para blanquear y descontaminar las pieles de los animales mediante oxidación de los restos de sales del tratamiento de eliminación del pelo.
- 15 A continuación, opcionalmente, se lleva a cabo un tratamiento con una solución alcalina como, por ejemplo, hidróxido cálcico, hidróxido sódico o sistemas tampón alcalinos con o sin enzimas para reblandecer, especialmente las pieles muy compactas y para eliminar los restos de grasa y otros restos o impurezas presentes en las pieles tratadas.
- 20 Por último, una vez acondicionadas las pieles, la fuente de colágeno es sometida a acidificación para su procesado en el método de la invención. Para la acidificación las pieles se someten a sucesivos lavados en medios ácidos, por ejemplo, con HCl al 33%, para llevar el pH a entre 0,1 y 4. Este pH es el adecuado para el hinchamiento de la piel así como para la transformación de este material y para hacer las fibras accesibles en los tratamientos
- 25 mecánicos subsiguientes.

- Después del tratamiento mecánico, la etapa b) del método de la invención está dirigida a obtener una masa, preferiblemente con un porcentaje entre 3 y 7% de colágeno y reduciendo al máximo o incluso eliminando por completo la presencia de gelatina. Esta etapa implica
- 30 diluciones sucesivas mediante molienda y una posterior homogenización en condiciones controladas manteniendo la temperatura por debajo de 25°C . El resultado de esta etapa es una masa con un elevado porcentaje de colágeno nativo no desnaturalizado.

- Después se lleva a cabo la extrusión de la masa a través de una cabeza de extrusión para
- 35 producir un film de colágeno de dimensiones variables en función de la masa de colágeno a

extrusionar. En una realización particular, por ejemplo, el film puede tener unas dimensiones de 12 cm de ancho x 0.6mm de espesor. Este film producido es procesado en las siguientes etapas.

- 5 Dado que el film extruido todavía se encuentra a un pH fuertemente ácido, la etapa d) comprende la neutralización del film mediante un agente alcalino en solución hasta un pH de entre 6 y 9. Cualquier agente alcalinizante apropiado puede ser usado ya sea una base fuerte o una base débil. De manera preferente la neutralización se lleva a cabo mediante un baño en una solución básica de hidróxido sódico o potásico. El intercambio iónico entre el film de
- 10 colágeno y la solución lleva un tiempo en función de la velocidad de difusión. Normalmente, tiempos de entre 1 y 60 minutos son suficientes para la neutralización de la masa de colágeno. Opcionalmente, como preparación para la etapa de secado el film neutralizado puede lavarse una o varias veces.
- 15 La etapa e) comprende el secado del film neutralizado hasta una humedad de entre 1 y 16%. Es importante que el secado se lleve a cabo a baja temperatura para evitar la posible desnaturalización del colágeno. El secado se puede llevar a cabo por diferentes medios, aunque idealmente se lleva a cabo en secaderos mediante aire forzado y a temperaturas inferiores a 60°C hasta que el producto alcanza dicha humedad, lo cual puede ser desde unas
- 20 pocas horas hasta 24 horas, en función de la capacidad del secadero.

Por último, en la etapa f) después del secado, el film es triturado o molido hasta obtener el polvo de colágeno de la invención. El molido se puede llevar a cabo por cualquier método o medio, aunque siempre evitando que la temperatura suba por encima de la temperatura de

25 desnaturalización en el proceso. De manera preferente el molido se lleva a cabo en una picadora con control de temperatura para que no supere 25°C y de manera aún más preferente se lleva a cabo por criomolturación con ayuda de nieve carbónica o sustancia criogenizante similar. La criomolturación tiene la ventaja de que permite alcanzar la temperatura de transición vítrea del colágeno, convirtiéndolo en un material frágil y susceptible

30 de ser fragmentado en pequeñas partículas durante el proceso de picado pero sin desnaturalizarlo. El polvo seco de colágeno de la invención tiene una granulometría (medida mediante un analizador de tamaño de partículas por difracción láser Mastersizer 3000 de Malvern Instruments) media entre 10 µm y 5 mm, y preferentemente con un 80% de partículas entre 250 y 2000µm.

35

Complemento o ingrediente alimentario o dietético

Otro aspecto de la invención es un complemento o ingrediente alimentario que comprende el polvo seco de colágeno de la presente invención.

- 5 El complemento o ingrediente alimentario además de contener el polvo de colágeno, puede contener otros ingredientes como conservantes, antioxidantes, colorantes, saborizantes o cualquier otro componente utilizado comúnmente en la industria alimentaria.

10 El complemento o ingrediente de la presente invención está pensado para su incorporación a cualquier alimento con el fin de aumentar su poder saciante. En otras palabras, el complemento de la invención puede ser útil en el contexto de un tratamiento dietético para reducir el apetito y perder peso con fines meramente estéticos pero también puede ser de utilidad en tratamientos médicos para combatir la obesidad y la resistencia a la insulina en pacientes prediabéticos o diabéticos.

15 Por otro lado, el complemento de la invención es tanto de aplicación en alimentación humana como en alimentación animal.

Producto alimentario

- 20 De alguna manera relacionado con el anterior aspecto, es también objeto de la presente invención un producto alimentario que comprende el polvo seco de colágeno de la invención o el complemento o ingrediente de la invención.

25 El producto alimentario puede ser tanto un producto procesado como no procesado al cual se le ha incorporado el polvo o el complemento o ingrediente de la invención. De manera particular, y sin pretender ser una lista exhaustiva, el producto alimentario puede ser un producto cárnico, un producto lácteo, una pasta, un ovoproducto, un derivado de pescado, etc

Uso del polvo seco de colágeno, del complemento o ingrediente y del producto alimentario de la invención

30 Un último objeto de la invención es el uso del polvo seco de colágeno de la invención, así como del ingrediente y del producto alimentario de la invención.

Por un lado, hay que destacar el uso médico del polvo de la invención y productos derivados de este, de aplicación tanto en medicina humana como en veterinaria y, por otro, el uso dietético como producto saciante.

- 5 Así, por un lado, el polvo de la invención puede usarse como medicamento, en particular, puede usarse como medicamento en el tratamiento y/o prevención de la obesidad y enfermedades relacionadas a ésta como el síndrome metabólico, la diabetes y la resistencia a la insulina.
- 10 Por otro lado, el polvo de la invención, el complemento o ingrediente o el producto alimentario de la invención tienen un uso como saciante en seres humanos o animales para la reducción del apetito y con el objetivo final de pérdida de peso, siempre y cuando no existan además procesos patológicos que por sí mismos estén provocando también pérdidas de peso. Se podría considerar este uso como un uso dietético o estético.
- 15 La manera en que puede usarse el polvo o el aditivo de la invención es mediante suplementación en cualquiera de las comidas del día ya sea en el desayuno, la comida o la cena aunque de manera preferente en el desayuno.
- 20 También puede incorporarse durante el proceso de fabricación de alimentos procesados para aumentar el poder saciante de estos y dando lugar a un producto alimentario de acuerdo con la presente invención.

EJEMPLOS

- 25 A continuación, se ilustra mediante algunos ejemplos la forma en la que puede efectuarse la preparación del polvo de la invención, así como unos ejemplos donde se caracteriza el polvo por medio de diferentes parámetros y se comparan estos parámetros con otros polvos de colágeno comerciales. Igualmente se aportan ejemplos in vivo sobre ratas que demuestran el efecto de pérdida de peso causado por el polvo de colágeno de la invención, así como el
- 30 efecto saciante. Estos ejemplos se presentan a modo de demostración, pero en ningún caso pretenden suponer un límite a la invención.

Ejemplo 1: Preparación de polvo de colágeno

La materia prima de referencia utilizada para la preparación del polvo fue piel de origen bovino.

- 35 Esta materia prima es bien conocida al igual que los métodos de extracción del colágeno, por

lo que se considera un material idóneo para la elaboración de colágeno nativo en polvo con potencial saciante.

A partir de pieles de terneros jóvenes (aproximadamente 2 años) se separó la capa interna de la piel llamada corion de otras capas que no son de interés como la capa de la flor, la carne y la grasa. Esta capa corion es rica en proteína de colágeno, concretamente más del 80 % de la proteína total es proteína de colágeno y es lo que se conoce como Split.

Una vez obtenida la parte rica en colágeno, el Split, se comenzó el tratamiento químico de purificación y extracción del colágeno que consistió de las siguientes etapas:

1. Se realizó un pretratamiento con peróxido de hidrógeno que produjo la oxidación de las sales residuales para que puedan ser solubilizadas y eliminadas posteriormente mediante lavado. Para ello, se añadió la materia prima junto con el peróxido de hidrógeno al 35% hasta una concentración final de 0,58% (%V/P); y se mezcló durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez terminado el tratamiento con el agua oxigenada, se drenó el líquido y se realizaron 2 lavados de 30 minutos cada uno con agua.
2. Posteriormente se procedió a una acidificación controlada con ácido clorhídrico hasta llegar a una concentración final 13,85% (%V/P), y se deja actuar al menos durante toda la noche a temperatura ambiente. Trascurrido este paso se produjo un lavado con agua, para eliminar el exceso de ácido de la etapa anterior obteniendo así los "Rinds" (ver Figura 2).

A partir de estos Rinds, se procedió a la extracción de las fibras de colágeno nativo mediante un procesamiento mecánico de picado en dos fases; picado grueso y picado fino, con ayuda de una picadora de carne (Gesame GP32). De esta forma, se obtuvo una pasta heterogénea y con alto contenido en sólidos. Para llevar a cabo la transformación de esta pasta de colágeno en films de calidad adecuada, fue necesario una etapa de amasado y dilución de la masa. Para ello, se amasó la pasta de colágeno con la cantidad necesaria de agua y/o hielo en una amasadora Z-blender hasta un porcentaje de sólidos final entre 4 y 7%. A partir de esta masa diluida se elaboraron los films de colágeno a temperatura ambiente, mediante una laminadora (Vansda, Thermal Laminator). Los films se sometieron a un baño de hidróxido amónico diluido (0.03%) y se lavaron con agua. Finalmente, estos films húmedos se dejaron secar a temperatura ambiente.

Finalmente, los films secos se picaron hasta obtener un polvo con un tamaño medio de partícula inferior al milímetro.

Con este fin, se llevó a cabo la criomolturación de los films de colágeno para la obtención de un particulado fino con aspecto de copo. Para este proceso de criomolturación se utilizó un robot de cocina (Robot Coupé) con cuchilla dentada. Se introdujeron las muestras de film junto con nieve carbónica en una proporción 1:3, y se procedió a la molturación del material a máxima velocidad durante 5 minutos.

Gracias al uso de la nieve carbónica, se logró alcanzar la temperatura de transición vítrea del colágeno previamente descrito, convirtiéndolo en un material frágil y susceptible de ser fragmentado en pequeñas partículas durante el proceso de picado y sin desnaturalizarlo. Se obtiene así, un colágeno en polvo con un tamaño medio de partícula entre 250 y 1000 μm .

Se llevó a cabo el análisis de las muestras obtenidas tanto en producto intermedio como en producto final. Se analizaron los siguientes parámetros obteniéndose los resultados de la tabla 1:

Tabla 1 Valores de Humedad, pH, Hinchamiento ácido del polvo de la invención del ejemplo 1

	Colágeno en polvo
% Humedad	13,7%
pH	7,6
% Hinchamiento ácido	1620%

Ejemplo 2: Observación de fibras de colágeno por microscopía óptica

Se han dispersado cantidades conocidas de las muestras de polvo de colágeno de la invención obtenidas de acuerdo con el ejemplo 1 en HCl 20mM de forma que se obtuviera una concentración de colágeno al 0.8%. Esta dispersión ha sido realizada con ayuda de ULTRA-TURRAX®. El polvo ha sido añadido poco a poco mientras se realizaba la agitación durante unos 5 minutos. Una vez generada la mezcla se deja 24 horas a 20°C.

Al día siguiente la mezcla obtenida se procesa para obtener diluciones diferentes (entre 1:10 y 1:100) y pequeñas fracciones de las diluciones preparadas se tiñen con el tinte Sirius Red. En la Figura 3 se pueden observar con gran detalle las capturas de microscopio a distintas diluciones en donde se aprecian las fibras de colágeno de diferentes tamaños y con diferentes grados de agregación. Se pueden apreciar desde fibrillas de diámetros muy pequeños (3B) hasta fibras de más de 20 μm (3C) y más de 1 mm de longitud (3A).

Ejemplo 3: Fracción soluble en Sulfato amónico

Una manera rápida de cuantificar el grado de degradación e hidrolisis del colágeno nativo consiste en determinar la fracción soluble a 10% de sulfato amónico tras centrifugar a 18.000rpm el polvo de colágeno previamente resuspendido en HCl 25mM. Dicha fracción, que contiene la gelatina, aparece especialmente en colágenos deteriorados.

Posteriormente se cuantifica el contenido de proteína de colágeno en dicha fracción con el método Biuret y el resultado se expresa en porcentaje.

En la tabla 2 se muestra la fracción soluble (en porcentaje) de las muestras de polvo de colágeno de la invención (P1 y P2) en comparación con otros polvos de colágeno comerciales:

Tabla 2 Porcentaje de la fracción soluble de dos lotes de polvo de la invención (P1 y P2) y de otros polvos de colágeno comerciales

	P1	P2	Kapro C®	Kapro SF®	Collapro® polvo fino
% G	0,0	2,0	14,5	20,2	18,1

Ejemplo 4: Análisis DSC para determinar el estado nativo del colágeno

Para analizar el estado nativo del colágeno se recurrió a un análisis DSC tanto de una muestra del polvo de la invención así como de otras dos muestras de polvos de colágeno comerciales (Collapro® y Kapro®).

Se pesaron las muestras del orden de 3-25mg, dependiendo del contenido en agua y se encapsularon en crisoles de aluminio herméticos para evitar la evaporación del agua. Se pesaron los crisoles sellados con las muestras.

- 5 En un equipo de DSC se hizo el scan a velocidad de 10°C/min. Se volvieron a pesar los crisoles después del scan para comprobar que no habían perdido muestra o agua. Se inició el scan a una temperatura de por lo menos 25°C inferior a la que se esperaba para la primera transición (desnaturalización p.ej.), en este caso a 15°C. Para el análisis del termograma aplicando el software y su interpretación las claves en el colágeno son: temperatura de
10 desnaturalización (estabilidad triple hélice), entalpía de desnaturalización (cantidad de colágeno cristalino, ordenado, nativo), temperatura y tamaño de la Tg (temperatura de transición vítrea) y la forma del termograma. La desnaturalización del colágeno es un proceso endotérmico, es decir, aparece un pico más o menos ancho por encima de la línea de base. La temperatura en la que se observa este pico dependerá del contenido de agua de la muestra
15 de colágeno, siendo de 110- 120°C para el colágeno con bajo porcentaje de agua.

En las figuras 1A-C que muestran el resultado del análisis DSC se observa cómo el polvo de la invención presenta un pico característico de un colágeno nativo (Figura 1A) mientras que las muestras de Collapro® (Figura 1B) y Kapro® (Figura 1C) muestran un claro perfil de
20 colágeno desnaturalizado sin ningún pico endotérmico característico del colágeno nativo. Sus perfiles presentan picos alrededor de los 82°C, como en el caso de la gelatina que también presenta un pico a 82°C, además de otro a 53°C (Ver Figura 1D). Por tanto, las muestras de 1B y 1C se trata de polvos con mucho colágeno desnaturalizado (gelatina) y escaso colágeno nativo.

25 **Ejemplo 5: Ensayo Bloom (norma ISO9665)**

Para observar las diferencias entre las distintas muestras de colágeno en polvo se llevan a cabo las medidas de fuerza de gel, a través del ensayo de grados Bloom. Este ensayo permite analizar la manera en que gelifican las diferentes muestras de colágeno.

- 30 Para ello, se disolvieron 7,5 gramos de cada muestra a ensayar en 105 mL de agua destilada, lo que corresponde a una concentración del 6,67%, mediante agitación con una varilla de vidrio. Seguidamente, para mejorar la uniformidad de las muestras y previamente al calentamiento a 65 °C, todas las dispersiones de los diferentes polvos de colágeno se sometieron a una homogenización en Ultra-Turrax a 15000 rpm durante 1 min.

Tras la homogeneización de las dispersiones en el Ultra-Turrax, se procede a efectuar un calentamiento de las mismas en un baño con agua a 65 ± 1 °C durante 15 min, removiendo suavemente a lo largo de este tiempo un par de veces cada dispersión con una varilla de vidrio.

5

Seguidamente, se tapan con parafilm los recipientes (jarra de diámetro interno 59 ± 1 mm y 85 mm de alto, específica para la medida de los grados Bloom), y se dejan reposar a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente, se introducen en el baño con agua a $10,0 \pm 1$ °C durante 17 ± 1 h. Transcurridas las 17 h, se retiran las jarritas con las gelatinas ya formadas del baño con agua, y se atemperan a temperatura ambiente durante 1 h. Finalmente se llevan a cabo las medidas de cada muestra en el analizador de textura a 20 °C.

10

La medida se realiza mediante la penetración de un cilindro (0.5" Radius Cylinder Probe P/0.5R) en la gelatina contenida en la jarrita, utilizando la célula de 5 kg y a una velocidad de deformación de 0,5 mm/s de acuerdo con la Norma ISO.

15

Una vez alcanzada una fuerza de 4 g, el cilindro penetra el gel hasta una profundidad de 4 mm, y la fuerza necesaria para alcanzar dicha profundidad es la denominada 'Bloom Strength' (g) del gel.

20

Los resultados para las diferentes muestras ensayadas se muestran en la tabla 3:

Tabla 3. Grados Bloom de dos lotes de polvo de la invención (P1 y P2), Kapro C® y Kapro SF® y una gelatina comercial

25

	P1	P2	Kapro C®	Kapro SF®	Gelatina
Grados Bloom	43	45	112	67	108

La Figura 4 muestra los geles obtenidos para cada una de las muestras ensayadas. En relación a las muestras de los polvos de la invención P1 y P2 es preciso señalar que una vez gelificaron las muestras mostraban un sobrenadante líquido de aproximadamente 1 cm de

espesor (ver Figura 5). Para realizar la medida del ensayo Bloom, fue necesario retirar dicho sobrenadante dado que el ensayo no comienza hasta que el émbolo no alcanza una resistencia mínima de 4g y el agua no ofrece esa resistencia. Es por tanto destacable la baja aptitud para gelificar del polvo de la invención. Incluso a pesar de que durante el proceso analítico se calienta la muestra a 65°C durante 15 minutos, parece ser que no produce un efecto de gelatinización completa del colágeno del polvo de la invención, probablemente por la alta resistencia a la desnaturalización del colágeno de la invención, lo cual confirma una vez más la proximidad del mismo al colágeno en estado nativo.

10 **Ejemplo 6: Ensayo de digestión con pepsina**

El ensayo de digestión con pepsina permite simular las condiciones de digestión en el estómago y permite determinar el grado o porcentaje de colágeno no digerido al final del ensayo.

15 La hidrólisis enzimática selectiva del colágeno dará lugar a especies intermedias como peptonas, péptidos e incluso aminoácidos.

La enzima pepsina es una proteasa (endopeptidasa) que actúa sobre el enlace peptídico rompiéndolo, y liberando así el grupo amino y el grupo carboxilo.

20 Se ensayaron dos muestras de acuerdo con la invención (P1 y P2) así como muestras de Kapro C®, Kapro SF® y Collapro®. Se pesaron 0,6 gramos por muestra.

Se preparó la disolución de pepsina “simulante gástrico” a una concentración de 3,2 g/L y se esperó 15 minutos para la activación de la pepsina. Se añadió 40 ml por los 0.6 g de cada muestra y se dejó actuar a 37°C durante 40 minutos.

Se paró la reacción con NaOH 1N. Se filtró a través de filtros de 5-9 micras para obtener los sólidos no digeridos en el filtro y se secó a 160°C 1 hora en estufa de vacío.

30 Los resultados (ver tabla 4) se expresaron como porcentaje de colágeno no digerido frente a colágeno inicial en extracto seco. Para ello se llevaron a cabo los siguientes cálculos:

En esta técnica se debe tener en cuenta el porcentaje de humedad de los polvos de colágeno.

- *Cálculo del peso seco colágeno inicial:*

35

Peso seco colágeno inicial (Psi) = $P_{col} - (P_{col} \times \% \text{ humedad} / 100)$

- Cálculo de % sólidos no digeridos:

$$P_{sf} = P_s - P_p - P_f$$

$$\% \text{ Sólidos no digeridos} = (P_{sf} \times 100) / P_{si}$$

Siendo:

10 Psi = Peso seco colágeno inicial

Pcol = peso muestra colágeno (g)

Psf = peso seco sólidos final (g)

Ps = peso seco (g)

Pp = peso platillo (g)

15 Pf = peso filtro (g)

Tabla 4 Porcentaje de colágeno no digerido de dos lotes de polvo de la invención (P1 y P2), Kapro C® y Kapro SF® y Collapro®

20

	P1	P2	Kapro C®	Kapro SF®	Collapro® polvo fino
% No digerido	37	42	10	2	0

Se observa claramente una mayor resistencia a la digestión enzimática del polvo de la invención frente a otros productos comerciales, que en algunos casos es digerido completamente. Se cree que la mayor resistencia a la degradación enzimática en este “simulante gástrico” provoca un retraso en la digestión y, por tanto, aumenta el efecto saciante del producto.

25

Ejemplo 7: Ensayo de hinchamiento o swelling ácido

El swelling (SW) o hinchamiento mide la capacidad de retención de agua del colágeno en medio ácido en condiciones de pH similares a las del estómago. Se ensayaron dos muestras del polvo de la invención (P1 y P2) así como tres muestras de polvos de colágeno comerciales (Kapro C®, Kapro SF® y Collapro®).

Para ello se pesaron 0,6g de colágeno en polvo de cada muestra en un tubo falcon apto para centrífuga y se añadieron 30ml de HCl 0.1N. Tras agitar, se dejó reposar durante 2h a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 10 minutos a 18000 rpm a 23°C. Se eliminó el sobrenadante y se recogió el pellet para pesarlo inmediatamente. Se dejó secar la muestra en una estufa a 160°C hasta peso constante.

Se calculó el % de swelling mediante la fórmula:

$$\% \text{ SW} = ((\text{PH} / \text{PS}) \times 100) - 100$$

Donde:

- PH: peso húmedo
- PS: peso seco

Los resultados del ensayo de swelling se muestran en la tabla 5:

Tabla 5 Resultados de hinchamiento SW(%) de dos lotes de polvo de la invención (P1 y P2) así como dos muestras de polvos de colágeno comerciales (Kapro SF® y Collapro®).

	P1	P2	Kapro SF®	Collapro ® polvo fino
% SW	1978	1842	1468	1051

Estos resultados demuestran que las muestras del polvo de colágeno de la invención tienen una capacidad de retención de agua significativamente mayor que los productos comerciales.

Esto va a afectar directamente al poder saciante del polvo de la invención que será mayor que el de los otros polvos comerciales.

Ejemplo 8: Ensayo in vivo sobre la pérdida de peso

5 En este ensayo se evaluó un lote del polvo de colágeno equivalente al P1 y P2 de la invención seleccionado por sus posibles efectos en la pérdida de peso en un modelo *in vivo* con ratas que previamente habían desarrollado obesidad mediante la ingesta de una dieta alta en grasa y azúcares (HFS).

10 El esquema de trabajo propuesto para el presente ensayo se dividió en 3 etapas. La primera etapa fueron 4 semanas de aclimatación del modelo animal empleado, ratas Wistar con un peso aproximado de 50-75 gramos, al cual se administró dieta control (Envigo, dieta 2014S).

La segunda etapa comenzó cuando los animales habían alcanzado una media de 200 gramos
15 y duró 8 semanas. Consistió en la administración de una dieta en polvo alta en grasas y azúcares (Research Diets, dieta 12451) con el objetivo de inducir un modelo de obesidad por dieta, a excepción del grupo control que permaneció con dieta control en polvo.

Por último, la tercera etapa fue de tratamiento/intervención y consistió en administrar a los
20 grupos experimentales las siguientes dietas *ad libitum* (durante todo el día): dieta control; dieta alta en grasa y azúcares libre de proteína (HFSPF); y dieta libre de proteína (PF). Las dos últimas fueron suplementadas con proteína en un 14.3% M/M del peso total de la dieta. En el caso de los grupos caseína se suplementó la dieta con un 14.3% de caseína y en el caso de los grupos colágeno con un 10% de colágeno más un 4.3% de caseína hasta sumar el 14.3%
25 proteico. Los porcentajes de suplementación de las dietas se escogieron en base a la bibliografía estudiada y a los ensayos pilotos previos.

Los grupos experimentales con colágeno fueron suplementados además con triptófano hasta
30 igualar la cantidad de este aminoácido en el grupo caseína, dada la no presencia de este aminoácido esencial en el colágeno (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de aminoácidos esenciales (AE) en las dietas control y tratamiento. El triptófano se suplementó en base a la cantidad que contenía el grupo que solo recibía caseína. Los datos de AE se extrajeron de la composición proporcionada por la casa

fabricante de la dieta control. Para los datos de AE de caseína y de colágeno se realizó una estimación media de la información de varios productos comercializados

AMINOACIDOS ESENCIALES(AE)	AE CONTROL	AE CASEÍNA	%AE CON CASEÍNA	AE COLÁGENO	%AE CON COLÁGENO	% total AE dieta CASEÍNA (4.3%) + COLÁGENO (10%)	Cantidad suplementada en dieta colágeno
Threonine	0.50%	4.40%	0.15%	1.72%	1.20%	1.35%	No
Leucine	1.40%	8.30%	0.42%	2.62%	1.83%	2.25%	No
Isoleucine	0.60%	5.50%	0.18%	1.36%	0.95%	1.13%	No
Valine	0.70%	6.50%	0.21%	2.17%	1.52%	1.73%	No
Phenylalanine	0.70%	4.50%	0.21%	1.90%	1.33%	1.54%	No
Methionine	0.30%	2.50%	0.09%	0.54%	0.38%	0.47%	No
Lysine	0.70%	7.40%	0.21%	3.07%	2.15%	2.36%	No
Histidine	0.40%	2.80%	0.12%	0.72%	0.50%	0.62%	No
Tryptophan	0.20%	1.30%	0.06%	0.00%	0.00%	0.06%	0.14%

- 5 Tras el tratamiento se produjo el sacrificio de los animales y se extrajeron distintos tejidos para su posterior análisis.

El trabajo se desarrolló durante **dos semanas** consecutivas, en las que se controló la ingesta y el peso de los animales cada 2-3 días. Así, se emplearon un total de **55 animales** dispuestos en jaulas individuales, que fueron aleatorizados en los cinco grupos experimentales descritos a continuación (n=11 ratas /grupo):

- **Grupo 1: Grupo control (CT).** Administración de dieta 2014S (14.3 % M/M de proteína), *ad libitum* durante todo el día.
- 15 - **Grupo 2: Grupo dieta alta en grasa y azúcares libre de proteína + caseína (proteína control; HFSPF CAS).** Administración de dieta D12451px07 de Research Diets suplementada con caseína en cantidad equivalente al 14,3 % en peso seco del total de la dieta diaria.
- **Grupo 3: Grupo dieta alta en grasa y azúcares libre de proteína + colágeno HFSPF COL.** Administración de dieta D12451px07 de Research Diets suplementada con colágeno en cantidad equivalente al 10% en peso seco del total de la dieta diaria, más un 4.3% de caseína con el fin de igualar la ingesta proteica a la del control.
- 20 - **Grupo 4: Grupo dieta libre de proteína + caseína (proteína control, PF CAS).** Administración de dieta 93328 de Envigo suplementada con caseína en cantidad equivalente al 14.3 % en peso seco del total de la dieta diaria.
- 25 - **Grupo 5: Grupo dieta libre de proteína + colágeno (PF COL).** Administración de dieta 93328 de Envigo suplementada con colágeno en cantidad equivalente al 10% en peso seco

del total de la dieta diaria, más un 4.3% de caseína con el fin de igualar la ingesta proteica a la del control.

RESULTADOS: EVALUACIÓN DEL PESO.

- 5 A partir del tercer día de tratamiento se observó un descenso en el peso de las ratas especialmente drástica en los grupos suplementados con colágeno tanto en la dieta HFSPF como en PF (Figuras 6 y 7). De hecho, la pérdida de peso en los grupos suplementados con colágeno consiguió que tuvieran un peso similar al del grupo control al final del estudio (Figura 6). Por otra parte, en los grupos suplementados con caseína
10 no se observaron grandes cambios en el peso (Figuras 6 y 7).

- Para descartar que esta pérdida de peso fuera debida a deshidratación, ya que el colágeno no digerido podría estar reteniendo agua, se midió el consumo de agua de los animales. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos
15 experimentales. Por lo que se descartó la deshidratación como causa de la pérdida de peso. Además, los animales no presentaban signos externos de deshidratación, ni ninguna otra alteración aparente.

EVALUACIÓN DEL PESO DE LOS ÓRGANOS Y TEJIDOS.

- 20 Durante el sacrificio de los animales se estudiaron a nivel macroscópico diferentes órganos que se extrajeron y fueron pesados para su posterior análisis. Además, se recogió muestras de varios ejemplares con el fin de realizar un análisis toxicológico.
- Así, se recogieron diferentes tipos de tejidos grasos que fueron referidos respecto al peso del animal, como la grasa epididimal, mesentérica, parda, retroperitoneal y subcutánea. Como se
25 muestra en la Tabla 7, todos los depósitos grasos (excepto el pardo) mostraron diferencias significativas con el tratamiento, con un menor porcentaje de estos tejidos respecto al peso del animal en los grupos colágeno que en los de caseína. Así que se puede concluir que el tratamiento con colágeno disminuyó significativamente el porcentaje de masa grasa afectando prácticamente a todos los depósitos adiposos de los animales.

30

Tabla 7. Peso en gramos de los órganos y tejidos respecto al peso del animal de los grupos experimentales suplementados con colágeno y caseína con las dietas HFSPF y PF. Test ANOVA 2x2. Los datos están representados como media del grupo $\pm$ SEM.

	HFSPF CAS	HFSPF COL	PF CAS	PF COL	Dieta	Tratamiento	Interacción
G-EPIDIDIMAL	13.30 $\pm$ 0.91	10.42 $\pm$ 1.24	12.03 $\pm$ 0.84	10.57 $\pm$ 0.66		0.0254	
G.MESENT	5.815 $\pm$ 0.551	4.562 $\pm$ 0.321	4.849 $\pm$ 0.321	4.364 $\pm$ 0.392		0.0389	
G.PARDA	0.760 $\pm$ 0.038	0.792 $\pm$ 0.067	0.745 $\pm$ 0.061	0.884 $\pm$ 0.078			
G.RETRO	15.52 $\pm$ 1.15	11.48 $\pm$ 1.06	14.26 $\pm$ 0.67	11.07 $\pm$ 0.87		0.0005	
G.SUBCUT	7.967 $\pm$ 0.737	5.821 $\pm$ 0.517	7.678 $\pm$ 0.403	5.546 $\pm$ 0.481		0.0004	
G. VISCERAL	34.64 $\pm$ 2.45	26.46 $\pm$ 2.54	31.14 $\pm$ 1.58	26.01 $\pm$ 1.83		0.0034	
G. TOTAL	42.60 $\pm$ 3.07	32.28 $\pm$ 2.99	38.81 $\pm$ 1.96	31.55 $\pm$ 2.23		0.0017	
SOLEO	0.151 $\pm$ 0.011	0.158 $\pm$ 0.010	0.1573 $\pm$ 0.011	0.171 $\pm$ 0.007			
GASTRO	2.686 $\pm$ 0.112	2.373 $\pm$ 0.085	2.324 $\pm$ 0.025	2.447 $\pm$ 0.104			0.0204
HÍGADO	9.550 $\pm$ 0.185	9.230 $\pm$ 0.312	9.674 $\pm$ 0.383	10.89 $\pm$ 0.569			
BAZO	0.661 $\pm$ 0.036	0.534 $\pm$ 0.019	0.656 $\pm$ 0.038	0.704 $\pm$ 0.021			0.0060
RIÑÓN	2.270 $\pm$ 0.078	2.160 $\pm$ 0.045	2.237 $\pm$ 0.062	2.356 $\pm$ 0.035			0.0235

5

Al estudiar la grasa visceral (suma de todos los depósitos situados en la cavidad abdominal) y la grasa total (los anteriores más el subcutáneo), tanto en porcentaje respecto al peso como por gramos totales, también se observó una disminución en los suplementados con colágeno.

Por tanto, se concluye que la pérdida de peso en los grupos suplementados con colágeno se debió básicamente a la pérdida de grasa.

10

CONCLUSIÓN FINAL:

La suplementación con un 10% de colágeno en la dieta indujo un descenso de peso corporal que es atribuible a una disminución de la masa grasa, sin verse afectada la masa muscular ni apreciarse síntomas de deshidratación ni de alteraciones gastrointestinales, ni tampoco alteraciones macroscópicas de efectos tóxicos.

15

Ejemplo 9: Ensayo in vivo sobre el efecto saciante

Se evaluó la capacidad como agente saciante del polvo de colágeno de la invención, así como sus posibles efectos metabólicos en un modelo *in vivo* con ratas que previamente habían desarrollado obesidad mediante la ingesta de una dieta alta en grasa y azúcares (HFS).

20

Se emplearon ratas Wistar con un peso inicial aproximado de 50-75 gramos. El esquema de trabajo propuesto para el presente ensayo se dividió en 3 etapas:

25

La **primera etapa**, de aclimatación, se prolongó durante 3 semanas tras la recepción de los animales incluidos en el estudio, durante las cuales se administró dieta control (Envigo, dieta 2014S)

- 5 La **segunda etapa**, de inducción del modelo de obesidad, comenzó cuando los animales habían alcanzado un peso medio de aproximadamente 180 gramos y duró 7 semanas. Consistió en la administración de una dieta alta en grasas y azúcares (HFS-Research Diets, dieta 12451) con el objetivo de inducir obesidad y resistencia a la insulina en los animales, a excepción del grupo control (grupo 1) que permaneció con dieta control. Este grupo sirvió
10 como control del modelo de obesidad empleado.

Finalmente, cuando los animales alimentados con dieta HFS mostraron diferencias significativas de peso y composición corporal respecto al grupo control comenzó la **tercera etapa** del estudio que consistió en la fase de tratamiento/intervención. Durante esta fase todos
15 los animales recibieron dieta control y se llevaron a cabo paralelamente dos estrategias experimentales claramente diferenciadas, para evaluar el potencial efecto saciante del colágeno:

o La primera estrategia consistió en administrar a los grupos experimentales las dietas
20 *ad libitum* (durante todo el día). Se suplementó la dieta normal de las ratas con una cantidad de colágeno/caseína equivalente a un 7.5% en peso seco del total de la dieta. Junto con la dieta, los animales disponían de acceso libre al agua para propiciar el incremento de volumen del colágeno y, de este modo, promover el efecto saciante debido a una mayor ocupación gástrica.

25 o Para La segunda estrategia experimental, tras un período de ayuno (o/n) de 12 horas, se administraron 4 g de dieta conteniendo el agente saciante o su control (ej. colágeno pulverizado o caseína equivalente al 7,5% p/p del total de la ingesta diaria), y se permitió a la rata alimentarse durante un período de 1,5 h para que ingiriese la mayor
30 cantidad posible. Tras este tiempo, y una vez confirmada la ingesta del agente saciante, se suministró dieta *ad libitum* durante las siguientes 10,5 horas. Durante todo este tiempo los animales tuvieron acceso libre al agua. Una vez evaluada la ingesta, se retiraron el alimento y el agua durante 12 horas (o/n) para mantener de nuevo los animales en ayuno hasta el día siguiente, en el que se repitió el procedimiento.

35

Siguiendo estas dos estrategias experimentales e incluyendo los correspondientes grupos control (grupos 1 y 2) se emplearon un total de 60 ratas Wistar dispuestas en jaulas individuales, que se distribuyeron en 6 grupos (10 animales por grupo) según el siguiente esquema desarrollado a lo largo de **siete semanas** consecutivas, en las que se controló la ingesta (diariamente).

- **Grupo 1:** Grupo de dieta control. Administración de dieta 2014S de Envigo ad libitum durante todo el experimento.

- **Grupo 2:** Grupo control obeso. Dieta HFS (dieta D12451, alta en grasa y sacarosa) ad libitum durante 7 semanas y dieta Control (2014S) las 7 semanas posteriores.

- **Grupo 3:** Grupo tratado con caseína las 24h (Casein 24h). 7 semanas de dieta HFS (D12451). Después, dieta Control (2014S) suplementada con caseína equivalente al 7.5% p/p de la ingesta total diaria durante otras 7 semanas.

- **Grupo 4:** Grupo tratado con colágeno las 24h (Collagen 24h). 7 semanas de dieta HFS (D12451). Después, dieta Control (2014S) suplementada con colágeno equivalente al 7.5% p/p de la ingesta total diaria durante otras 7 semanas. 3/11

Grupo 5: Grupo tratado con caseína sólo por la mañana (Casein 2h). 7 semanas de dieta HFS (D12451). Después, dieta Control suplementada con caseína (equivalente al 7.5% p/p de la ingesta total pero sólo entre 8 y 9:30 am). El resto del día (9:30 am – 8:00 pm) dieta control (2014S) ad libitum. Ayuno “overnight” y al día siguiente se repite este protocolo.

- **Grupo 6:** Grupo tratado con colágeno sólo por la mañana (Collagen 2h). 7 semanas de dieta HFS (D12451). Después, dieta Control suplementada con colágeno (equivalente 7.5% p/p de la ingesta total pero sólo entre 8 y 9.30 am). El resto del día (9:30 am – 8:00 pm) dieta control (2014S) ad libitum. Ayuno “overnight” y al día siguiente se repite este protocolo

RESULTADOS: EVALUACIÓN DE LA INGESTA DE ALIMENTO.

A lo largo del ensayo se registraron diariamente datos de ingesta individualizada de cada una de las 60 ratas incluidas en el estudio. Durante las 7 semanas de intervención del estudio, la ingesta de los diferentes grupos oscilaba entre los 17 g y los 21 g diarios aproximadamente. La tendencia de ingesta entre los grupos se mantuvo más o menos constante a lo largo de las 7 semanas, siendo el grupo que recibía la dieta suplementada con colágeno 7.5% p/p a primera hora de la mañana (grupo 6) el que presentaba valores de ingesta más bajos. se observaron diferencias significativas de ingesta entre los diferentes grupos al analizar los datos mediante un análisis ANOVA que comparaba todos los grupos entre sí. En concreto, los grupos que siguieron un patrón de alimentación con suplementación de la dieta con

proteína a primera hora del día (grupos 5 y 6) ingirieron menor cantidad de dieta que el resto de grupos (Figura 8B).

5 Especialmente interesante resulta el análisis mediante Anova 2x2 de los datos de ingesta de los grupos 3-6 (Casein 24h, Collagen 24h, Casein 2h y Collagen 2h). Este análisis nos permite observar el efecto de los dos factores principales; el tipo de tratamiento y el tipo de proteína que recibían los animales. El análisis estadístico de los datos representados en la Figura 8C indica que existe una interacción significativa entre los factores protocolo y proteína. En el gráfico de interacción se observa que sólo en los grupos que siguieron el protocolo de 2h
10 (ingesta del tratamiento a primera hora de la mañana), la ingesta fue mayor cuando la proteína era caseína que cuando se trataba de colágeno. Los análisis que nos permiten concluir acerca de los efectos simples confirman esta hipótesis y se obtienen diferencias significativas en la ingesta entre el grupo Casein 2h y el grupo Collagen 2h cuando los animales siguieron el protocolo de suplementación de la dieta a primera hora de la mañana. Este resultado respalda
15 la hipótesis del potencial efecto saciante del colágeno cuando se administra a primera hora de la mañana y va en línea con los resultados anteriores en los que se observaba que este grupo 6 es el que presenta también una menor ganancia de peso.

Una vez observadas las diferencias de ingesta en función de la proteína suplementada en la
20 dieta cuando las ratas recibían el patrón de alimentación con la suplementación a primera hora de la mañana, el siguiente objetivo era tratar de elucidar los posibles mecanismos moleculares subyacentes al efecto saciante del colágeno observado.

Con este fin, se obtuvieron muestras de sangre de la cola de los animales pertenecientes a
25 los grupos 5 y 6 (Collagen 2h y Casein 2h) en ayuno, tras la ingesta de la dieta suplementada con la proteína, y 3 horas después de la ingesta de la dieta suplementada. Posteriormente se procesaron las muestras y se analizaron los niveles plasmáticos de ghrelina (hormona orexigénica que promueve la ingesta).

30 Resulta especialmente interesante ver que los niveles séricos de ghrelina disminuyeron significativamente en el grupo Collagen 2h en las horas posteriores a la ingesta del tratamiento en comparación con el grupo Caseína 2h (ver Figura 9).

EVALUACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.

En el sacrificio de animales, se obtuvieron muestras de suero y plasma para el posterior el análisis de los siguientes parámetros bioquímicos de interés (Tabla 9). Estas muestras de sangre fueron recogidas tras un ayuno de 12 h de las ratas. Como se puede ver en la Tabla 9, no se observaron cambios relevantes a nivel de metabolismo general de los animales en función del tipo de proteína con la que era suplementada la dieta, cuando los animales seguían un mismo patrón de alimentación. Únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de HDL-Colesterol y Colesterol que estaban disminuidos en el grupo Collagen 2h en comparación con el grupo Casein 2h. No obstante, al analizar el ratio Colesterol Total/HDL estas diferencias quedaban neutralizadas por lo que este resultado no tiene especial relevancia fisiológica.

Además, cabe destacar que no se observaron valores anormales de las transaminasas (ALT y AST) en ninguno de los grupos del estudio, lo que permite descartar cualquier efecto toxicológico.

El análisis mediante Anova 2x2 de los diferentes parámetros analizados incluyendo como factores principales el protocolo y el tipo de proteína que habían recibido los animales, se observó que únicamente para los marcadores de Colesterol, HDL-Col, triglicéridos e insulina, existían diferencias significativas en función del protocolo que habían seguido. El tipo de proteína que recibían los animales por su parte resultó un factor determinante en cuanto a los valores de ALT y AST. Para los dos protocolos llevados a cabo, los animales que habían recibido un tratamiento con colágeno presentaban valores más bajos de ambos marcadores (ALT y AST), lo cuáles muy prometedor ya que es conocido que una ingesta elevada de proteínas (por ejemplo, caseína) tiende a incrementar los niveles de transaminasas.

Tabla 8. Parámetros bioquímicos de los grupos experimentales incluidos en el estudio. Los datos están representados como media del grupo $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ vs HFS; * $p < 0.001$ vs HFS; ## $p < 0.01$ vs Casein 2h; b $p < 0.05$ vs col 24h; bb $p < 0.01$ vs col 24h.**

Nota: no se ha considerado el Grupo 1 (Control) en el análisis estadístico, utilizándose el Grupo 2 (Control HFS) como grupo de referencia para los ANOVA de 1 vía.

	CONTROL	HFS	CAS 24h	COL 24H	CAS 2H	COL 2H
Glucosa (mg/dL)	121.21 $\pm$ 1.2	129.07 $\pm$ 1.	131.13 $\pm$ 2.	132.18 $\pm$ 2.	129.68 $\pm$ 2.2	126.56 $\pm$ 3.1
	8	88	31	40	8	7

Insulina (µg/L)	0.75±0.07	1.34±0.18	1.47±0.19	1.50±0.28	1.47±0.25	1.29±0.28
HOMA-IR	5.59±0.51	10.72±1.57	11.76±1.46	12.21±2.34	11.87±2.12	10.33±2.60
Colesterol (mg/dL)	71.20±2.84	76.60±3.66	76.50±2.24	86.90±2.89	71.70±2.97	62.30±2.81* ,bb
HDL-COL (mg/dL)	23.51±0.88	23.34±0.72	24.58±0.56	25.72±0.66	25.16±0.88* **	21.49±0.74 ##, bb
Total Col/HDL-Col	3.03±0.06	3.27±0.07	3.11±0.06	3.38±0.05	2.85±0.05** *	2.90±0.07** *
Índice AIP	0.45±0.04	0.58±0.04	0.52±0.04	0.51±0.03	0.39±0.05*	0.40±0.05*
TG Suero (mg/dL)	69.40±8.19	91.10±7.56	84.40±8.30	86.20±7.54	65.20±8.23	57.00±7.65*
TG Hígado (mg/dL)	4.46±0.67	5.77±0.78	6.09±0.51	6.08±0.46	4.82±0.46	4.88±0.52
ALT (U/L)	37.22±1.81	43.35±2.27	45.64±2.25b	36.79±1.68	41.35±1.98	37.04±2.17
AST (U/L)	150.31±8.480	183.34±15.12	187.56±12.43	148.43±10.98	178.21±11.65	164.64±16.43

CONCLUSIÓN FINAL:

5 A nivel macroscópico y bioquímico no se observaron efectos negativos que pudieran estar motivados por la ingesta del colágeno. De hecho, los niveles de transaminasas fueron menores en los animales suplementados con colágeno que en los de caseína. Los resultados del presente estudio demuestran que el polvo de colágeno de la invención promueve una inhibición de la ingesta total diaria de los animales, cuando es suplementado en una única dosis a primera hora de la mañana. Estos efectos saciantes del colágeno podrían estar

10 causados, al menos en parte, por su mayor capacidad de hinchamiento en el estómago, lo

que promovería una menor liberación de ghrelina post-prandial inhibiendo de este modo la ingesta de alimento.

REIVINDICACIONES

1. Polvo seco de colágeno con propiedades saciantes caracterizado porque:
 - 5 a) más de un 70% del colágeno es nativo;
 - b) tiene un contenido en gelatina inferior al 4% en peso;
 - c) al menos el 95% del polvo presenta una granulometría de entre 10 μm y 5 mm.
2. Polvo de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque está constituido por
10 colágeno nativo en más del 80%, más preferiblemente en más del 90% y aún más preferiblemente en más del 95%.
3. Polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque
15 tiene un contenido en gelatina inferior al 2,5% en peso, preferiblemente inferior al 1% en peso, y aún más preferiblemente por ausencia de gelatina.
4. Polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque
presenta una granulometría media de entre 250 μm y 1 mm.
- 20 5. Polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que presenta una fracción de colágeno no digerido tras el ensayo de digestión de polvos con pepsina superior al 30%.
6. Polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el porcentaje de
25 hinchamiento en el ensayo de swelling ácido de polvos de colágeno es superior al 1550%.
7. Polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el colágeno es de origen bovino, ovino, porcino, aviar, de pescado o mezcla de los mismos.
- 30 8. Polvo de acuerdo con la reivindicación 7 donde el colágeno es de origen bovino y de un animal de edad entre 0 y 3 años, preferiblemente menor de 2,5 años.
9. Polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento
y/o prevención de la obesidad, el síndrome metabólico, la diabetes y la resistencia a la
35 insulina.

10. Complemento alimentario o dietético que comprende el polvo de colágeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

11. Producto alimentario que comprende un polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o un complemento de acuerdo con la reivindicación 10.

5

12. Uso de un polvo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, de un complemento de acuerdo con la reivindicación 10 o de un producto alimentario de acuerdo con la reivindicación 11 como saciante en seres humanos o animales.

10 13. Método para obtener un polvo de colágeno de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende:

a) Tratamiento mecánico de una fuente de colágeno, previamente acondicionada y acidificada, para la reducción del tamaño de las fibras hasta obtener una masa de colágeno;

15

b) Diluciones sucesivas de la masa de colágeno de la etapa a) a temperatura inferior a 25°C para obtener una masa de colágeno concentrada, con bajo o nulo grado de gelificación, manteniendo el estado nativo del colágeno;

c) Homogenización a temperatura inferior a 25°C y extrusión de la masa de colágeno de la etapa b);

20

d) neutralización de la masa de colágeno de la etapa c) con un agente alcalino hasta un pH de entre 6 a 9;

e) Secado de la masa de colágeno de la etapa d) hasta una humedad de entre 1% y 18%; y

25

f) Moler la masa seca de la etapa d) hasta obtener un polvo de colágeno.

14. Método de acuerdo con la reivindicación 13 donde el tratamiento de acondicionamiento y acidificación de la fuente de colágeno de la etapa a) comprende:

i. eliminar químicamente el pelo de la fuente de colágeno si la fuente utilizada los comprende,

30

ii. opcionalmente, uno varios lavados con agente oxidantes,

iii. opcionalmente un tratamiento alcalino para eliminar la grasa y otras impurezas de la fuente de colágeno; y

iv. acidificación de la fuente de colágeno a un pH de entre 0,1 y 4.

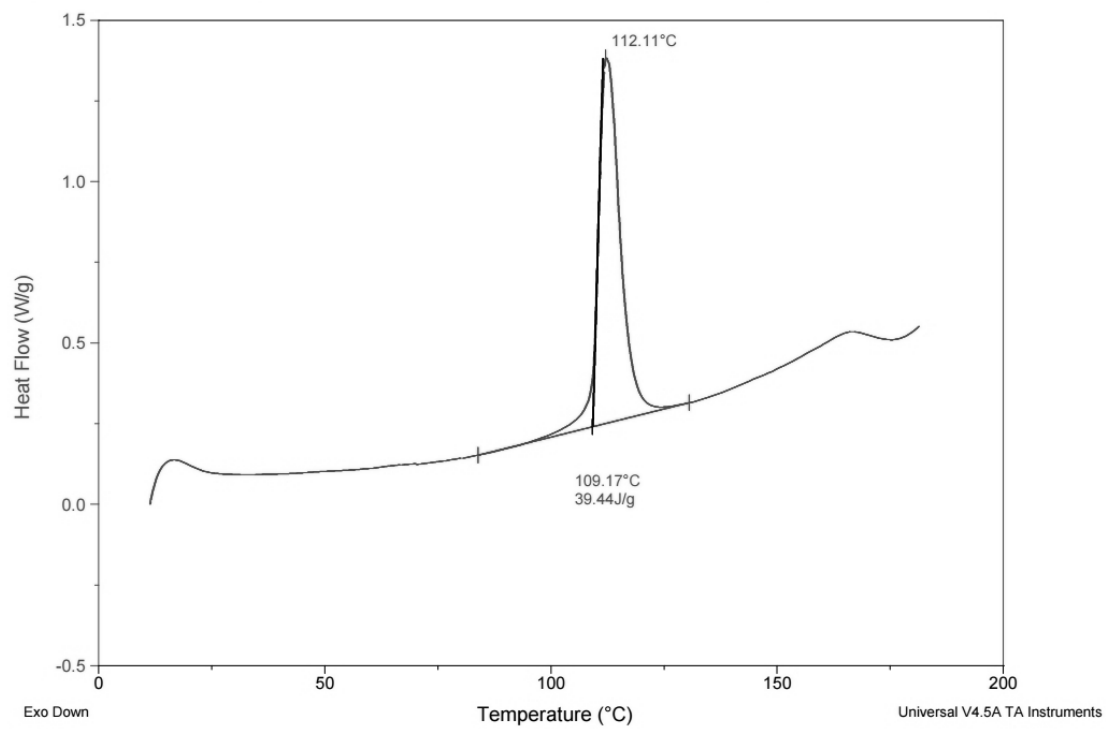


Fig. 1A

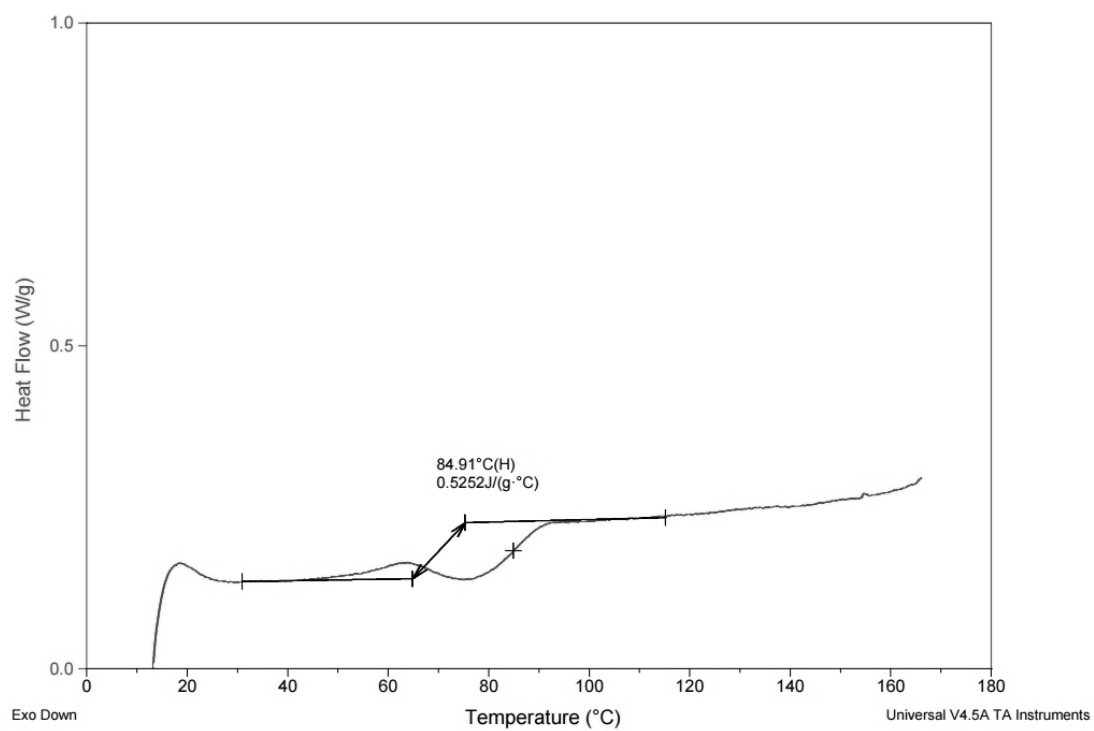


Fig. 1B

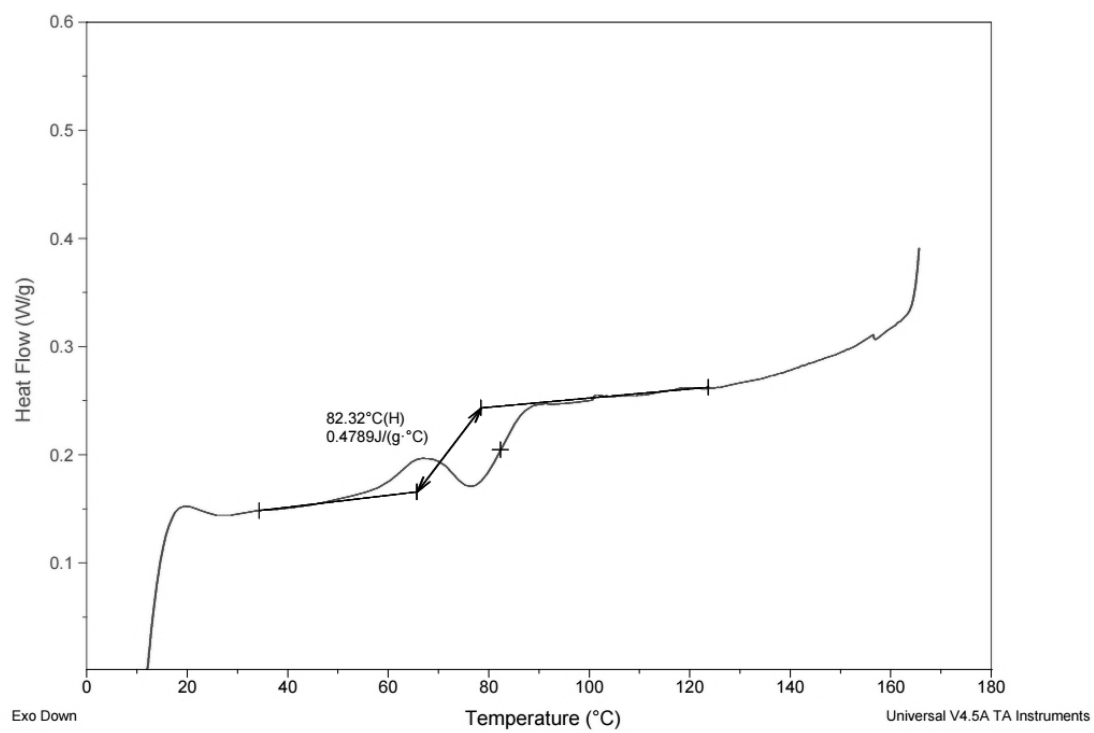


Fig. 1C

Sample: D17003-ta3

DSC File: C:\...\DSC\Muestras Viscofan\Tapa al revés\D17010-ta2.001

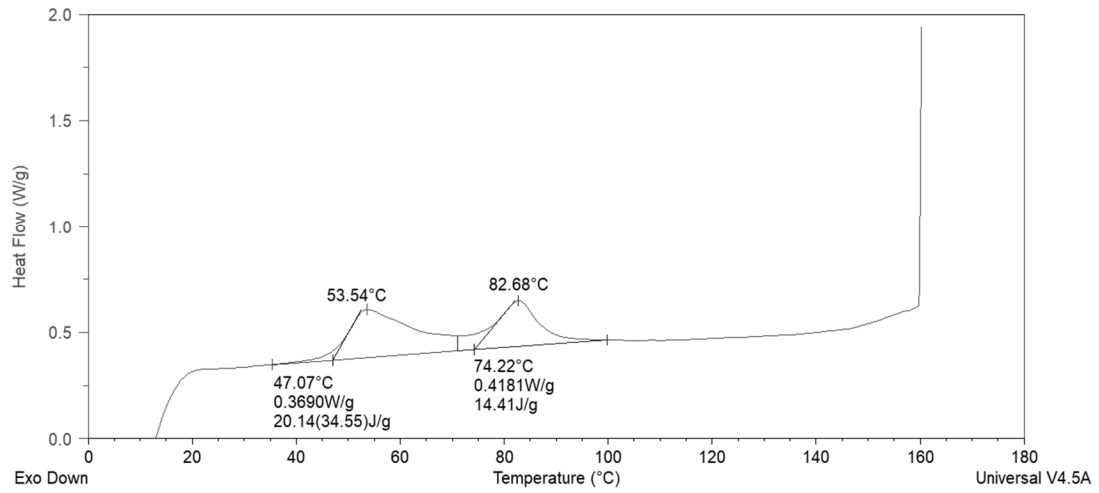
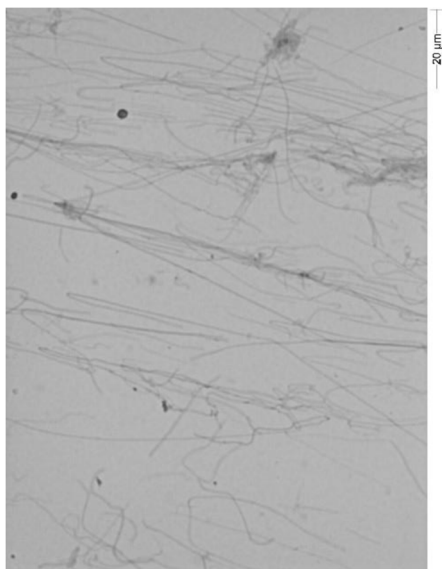


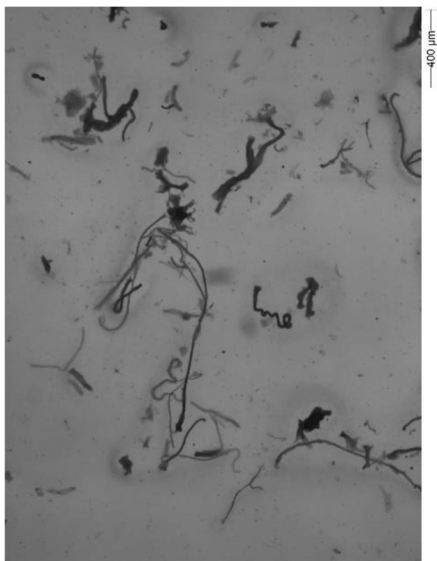
Fig. 1D



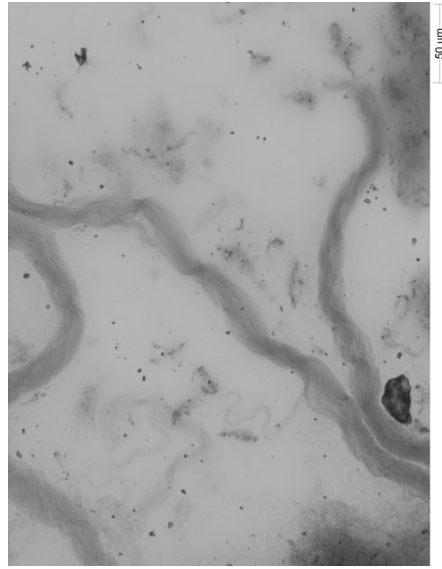
Fig. 2



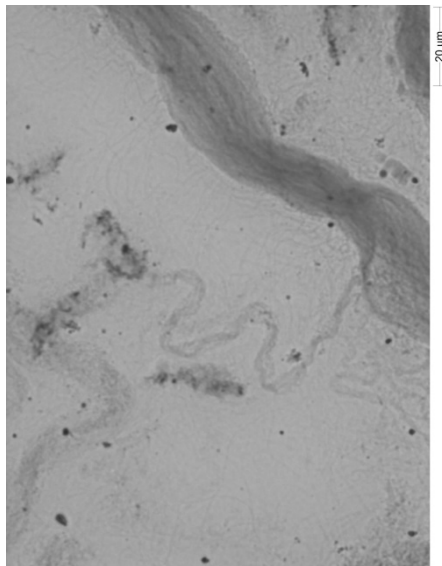
B



A



D



C

Fig. 3

P1	P2	Kapro C®	Kapro SF®	Gelatina
				

Fig.4



Fig. 5

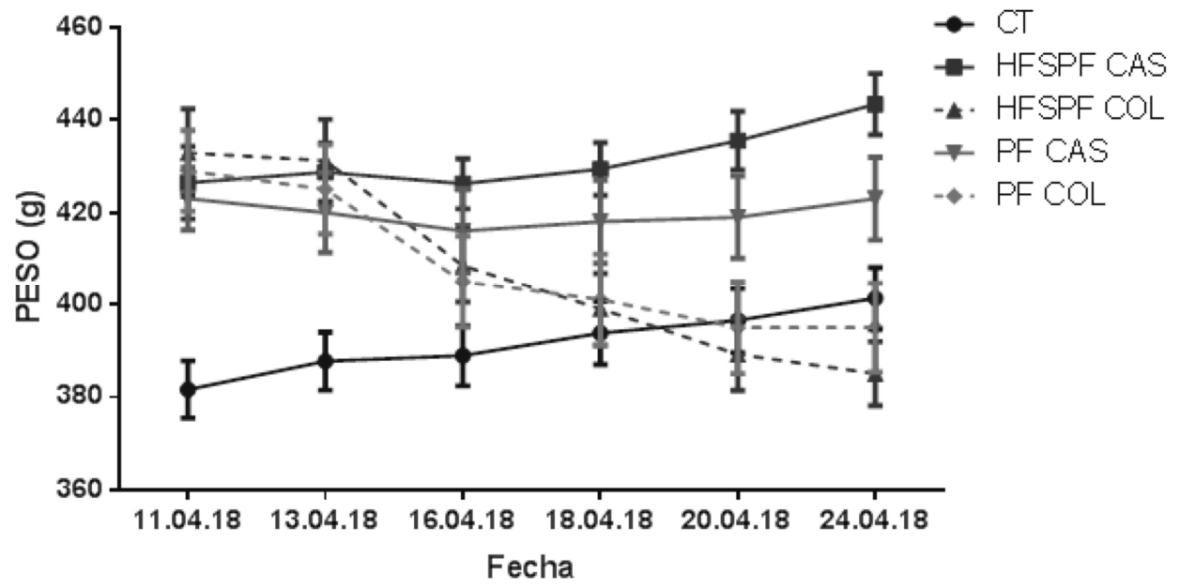


Fig. 6

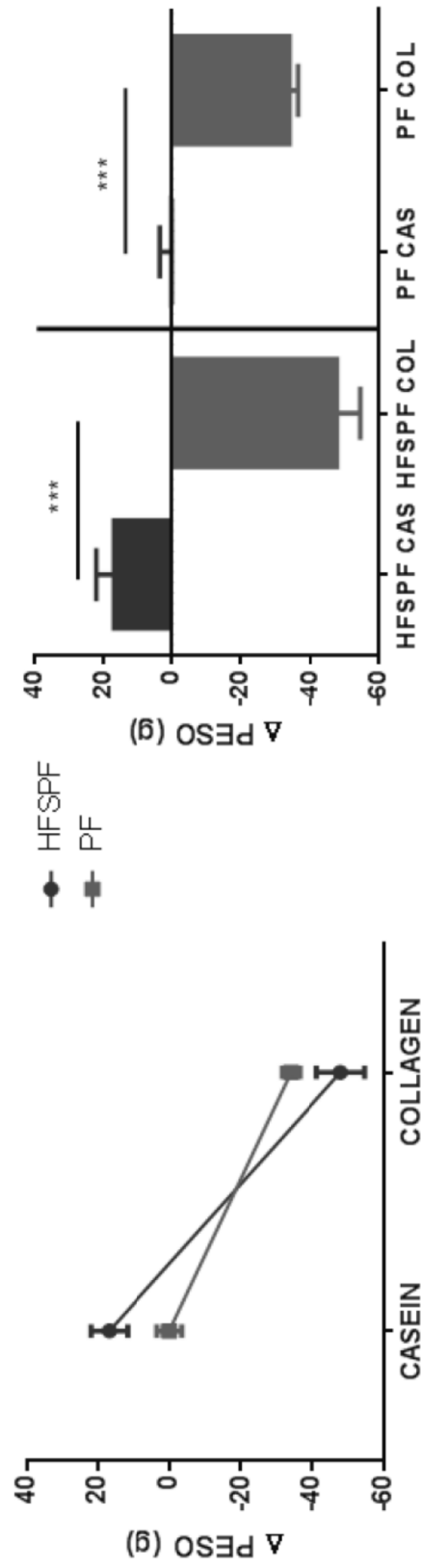


Fig. 7

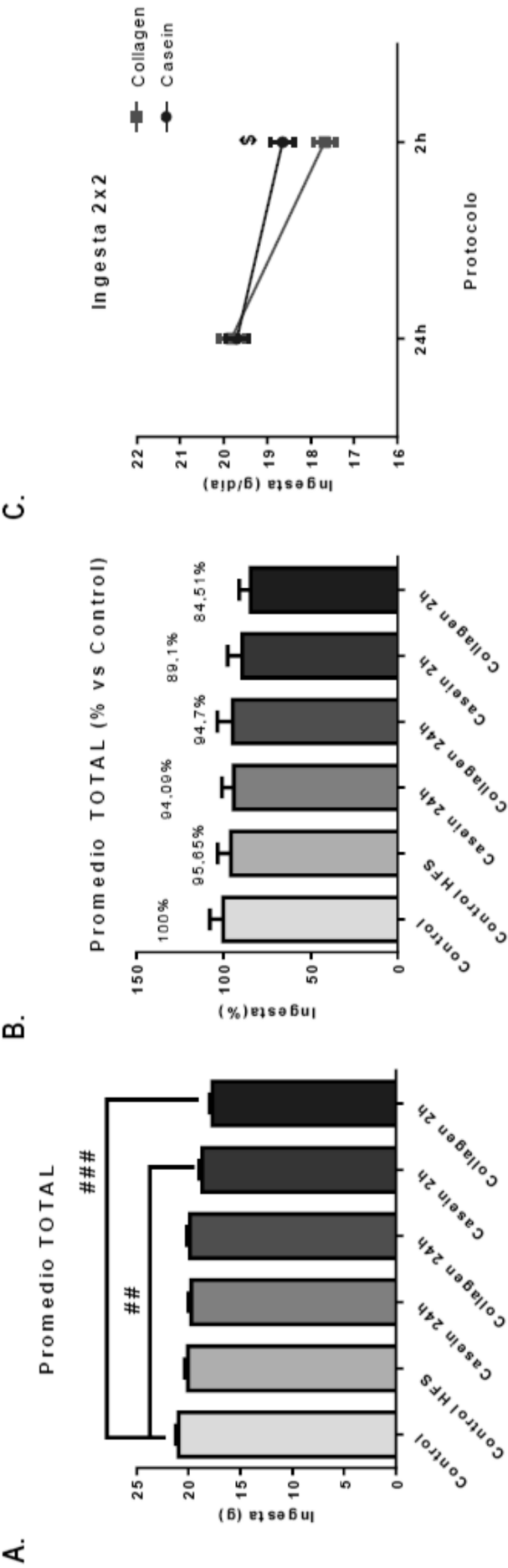


Fig. 8

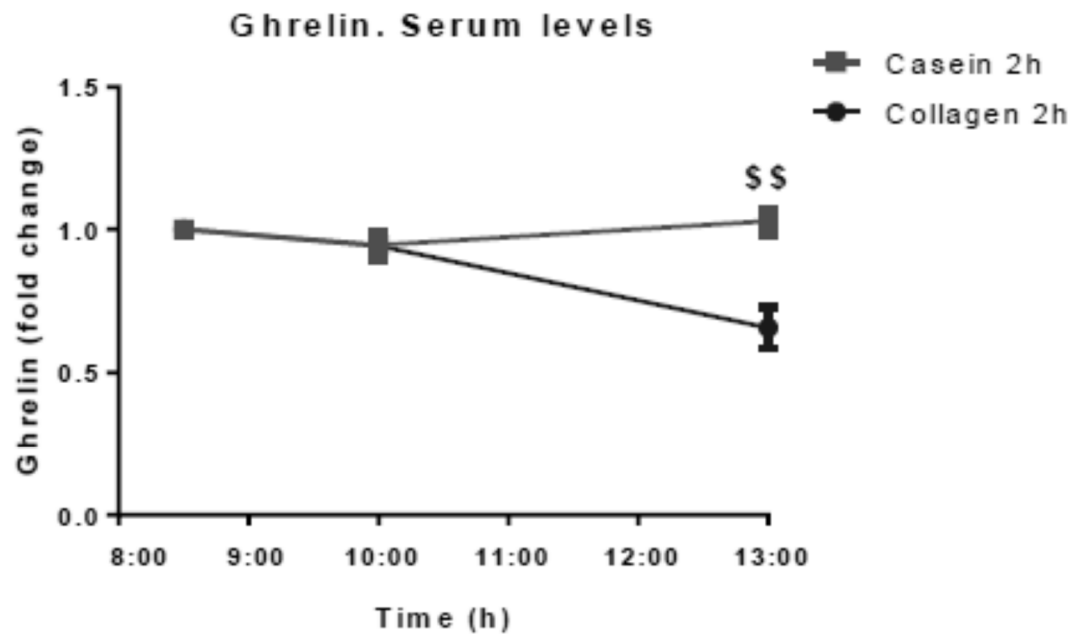


Fig. 9



- ②① N.º solicitud: 202030966
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.09.2020
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 2575496 A1 (HFP INGREDIENTS B V) 10/04/2013, párrafos 0020, 0025, 0040, 0051.	1-14
A	WO 9210944 A2 (STORK FIBRON BV et al.) 09/07/1992, reivindicaciones.	1-14
A	US 2011135699 A1 (DICK EBERHARD et al.) 09/06/2011, ejemplos 1-4.	1, 13
A	WO 0138396 A1 (NZ INST FOR CROP & FOOD RES et al.) 31/05/2001, ejemplo 1.	1, 13
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 10.06.2021	Examinador J. Manso Tomico	Página 1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23J3/04 (2006.01)

A61K38/39 (2006.01)

A61P3/04 (2006.01)

C07K14/78 (2006.01)

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

A23J, A61K, A61P, C07K

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, INTERNET SEARCH