



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 286 460**

(51) Int. Cl.:

A23L 1/303 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

A23L 1/275 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03753498 .9**

(86) Fecha de presentación : **02.10.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1545244**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **29.06.2005**

(54) Título: **Proteínas del lupin modificadas para la preparación de formas de productos que se dispersan en agua de compuestos solubles en la grasa.**

(30) Prioridad: **04.10.2002 EP 02022479**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

(73) Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

(72) Inventor/es: **Funda, Elger;**
Leuenberger, Bruno;
Beck, Markus y
Schaefer, Christian

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Proteínas del lupin modificadas para la preparación de formas de productos que se dispersan en agua de compuestos solubles en la grasa.

La presente invención se relaciona con nuevas proteínas del lupin, un proceso para la fabricación de las mismas y composiciones que contienen compuestos colorantes y/o ingredientes activos solubles en la grasa finamente divididos en una matriz basada en las nuevas proteínas del lupin y con un proceso para preparar estas composiciones. La presente invención se relaciona además con el uso de las nuevas composiciones de esta invención para la coloración y para el enriquecimiento o fortificación de alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos. Más particularmente, la presente invención se relaciona con nuevas composiciones que comprenden una proteína del lupin enzimáticamente y/o físicamente tratada y un compuesto colorante o ingrediente activo soluble en la grasa, con un proceso para preparar estas composiciones y el uso de estas composiciones como aditivos para la coloración y/o enriquecimiento o fortificación para alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos; y para alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos que contienen tales composiciones. WO 99/51106 se relaciona con una proteína del lupin modificada que tiene propiedades emulsionantes.

En un aspecto, la presente invención se relaciona con un proceso para la fabricación una proteína del lupin modificada, el cual comprende hidrolizar enzimáticamente una proteína del lupin de origen natural. Más particularmente, la invención se relaciona con un proceso el cual comprende ajustar una solución o suspensión acuosa de proteínas del lupin de origen natural teniendo un contenido de masa seca de desde 0,1 a 20% a pH 3 a 9, adicionar 0,01 a 10% en peso, con relación al peso de la proteína del lupin seca, de una proteasa, incubar la solución o suspensión de la proteína a una temperatura de desde 5 a 70°C hasta la obtención de un grado de hidrólisis de desde 1 bis 30%, inactivar la proteasa, y convertir el hidrolizado en una forma sólida. Si se requiere dicho hidrolizado de proteína puede ser físicamente fraccionado por métodos comunes tales como la centrifugación y/o ultra filtración.

El termino “ingrediente activo soluble en la grasa” como es usado aquí comprende vitaminas solubles en la grasa o compuestos funcionalmente relacionados los que pueden ser usados para el enriquecimiento o fortificación de alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos. Ejemplos de tales vitaminas solubles en la grasa son las vitaminas de los grupos A, D, E o K o derivados de las mismas tales como sus acetatos o sus ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Ejemplos de los compuestos funcionalmente relacionados son por ejemplo los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) o derivados de los mismos, triglicéridos ricos en ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) o el ácido γ -linolenico (GLA), o la coenzima Q 10 (CoQ 10). Incluidos además están los filtros solares solubles en la grasa, tales como los filtros UV-A y UV-B usados en las preparaciones cosméticas y de cuidado contra el sol.

El término “colorante” como es usado aquí comprende un caroteno o compuesto de polieno estructuralmente relacionado que puede ser usado como un colorante para alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos. Ejemplos de tales carotenoides son el α - o el β -caroteno, 8'-apo- β -carotenal, ésteres del ácido 8'-apo- β -carotenoico tales como el etil éster, cantaxantina, astaxantina, licopeno, luteína, zeaxantina o crocetina, α - o β -zeacaroteno o mezclas de los mismos. El carotenoide preferido es el β -caroteno. Se entiende que las sustancias anteriormente nombradas de las categorías “ingrediente activo soluble en la grasa” y “colorante” pueden también ser usadas como mezclas dentro de las nuevas composiciones de la presente invención.

El término “proteína del lupin de origen natural” se refiere a las proteínas que pueden ser aisladas de semillas (incluyendo semillas procesadas o preparadas) de cualquier variedad de la planta del lupin (por ejemplo, *L. albus*, *L. angustifolius* o variedades de las mismas), o a partir de productos desengrasados o harina completos tal como hojuelas blancas o fragmentadas. Los concentrados de proteína del lupin y los productos del lupin térmica o químicamente tratados pueden ser usados además para los propósitos de la invención.

El término “producto desengrasado” significa que las proteínas del lupin han sido desengrasadas antes de su tratamiento de acuerdo a los procesos de la invención. El desengrasado puede ser por ejemplo realizado de acuerdo a los métodos descritos en WO 99/17619 y WO 00/54608. En estos documentos, es descrito el tratamiento mecánico de las semillas del lupin para obtener hojuelas en forma de plaquetas, indirectamente calentar las hojuelas en ausencia de agua y subsiguientemente extraer los lípidos de los mismos usando un solvente, preferiblemente seleccionado del pentano, hexano, heptano y CO₂ supercrítico. El desengrasado puede ser realizado por ejemplo usando solventes polares u otros solventes no polares, por ejemplo mono- y poli-alcoholes C₁-C₆ alifáticos, mono- y poli-alcoholes C₅-C₁₂ aromáticos, alcanos C₁-C₁₂ cíclicos o ramificados, de cadena lineal alifáticos, etilmetilcetona, acetona, ésteres de alquil C₁-C₆ de ácido acético, alquil citrato C₁-C₄, diclorometano, dialquiléteres C₂-C₆ y dióxido de carbono supercrítico. Específicamente preferido entre los mono- y dialcoholes alifáticos y alcanos son el metanol, el etanol, el butan-1-ol, el butan-2-ol, el propan-1-ol, el propan-2-ol, el n-propanol, el 1,2-propilenglicol, el propano, el butano, el pentano, el hexano, el n-octano iso-octano, el ciclohexano.

En una realización preferida de la invención, las proteínas del lupin modificadas son obtenidas a partir de las soluciones o suspensión de la proteína del lupin natural que tienen un contenido de masa seca de desde alrededor de 5-15% en peso. La solución o suspensión es ajustada a pH 3-9, preferiblemente pH 4-8, por ejemplo, mediante la adición de un ácido o base 0.1-2 M tal como ácido clorhídrico e hidróxido de sodio, respectivamente y preferiblemente llevada a una temperatura de desde 40-60°C, especialmente 50C. La proteasa usada puede ser una proteasa que tiene

endo-actividad o exo-actividad. Mezclas de endo- y exo-proteasas pueden ser usadas. Las proteasas para el uso en el proceso de la invención están disponibles de los suministrados, Novozymes, Genencor, AB-Enzymes, Gist-Brocades etc. Las proteasas preferidas son aquellas de origen bacteriano o fúngico, por ejemplo del *Bacillus licheniformes* o *Aspergillus oryzae*. Las preparaciones de enzimas tales como Alcalase o Flavourzyme obtenidas de la firma Novozymes pueden ser usadas. La proteasa es adicionada para proporcionar una concentración de alrededor de 0.01 -10% en peso, preferiblemente alrededor de 0.1 - 1% en peso con relación al peso de la proteína del lupin. La hidrólisis enzimática es llevada a cabo hasta que un grado de hidrólisis de alrededor de 1-30%, preferiblemente 1-10% sea alcanzado. El grado de hidrólisis puede ser determinado de una manera conocida por aquellos versados en el arte, por ejemplo como se describió en Petersen, D., Nielsen, P.M., Cambmann C., Determinación del Grado de Hidrólisis (DH) basado en una Reacción OPA, ED-9512723, Novo Nordisk A/S, Dic. 1995; Frister, H., Meisel, H., Schlimme, E., Método OPA modificado por el uso de N,N-dimetil-2-mercaptoetilamonio cloruro como componente tiol, Fresenius J. Anal. Chem. 330 (1988) 631. La expresión "grado de hidrólisis" significa el número de enlaces peptídicos hidrolizados con relación a la suma total de los enlaces peptídicos en la proteína del lupin presente de manera natural en la mezcla.

La proteasa es entonces inactivada, apropiadamente por calentamiento del baño de incubación. En una realización preferida del proceso de la invención, la enzima es adicionada en un paso único. La hidrólisis enzimática puede además ser llevada a cabo de manera escalonada. Por ejemplo, la proteasa o una mezcla de proteasas es adicionada al baño de incubación en una cantidad de por ejemplo, 1% donde, por ejemplo, después de 5-10 minutos (a una temperatura de 50°C) la proteasa adicional o la mezcla de proteasas que pueden ser la misma o diferentes de la primera proteasa o mezcla de proteasas adicionadas es adicionada, por ejemplo en una cantidad de 2% donde el baño de incubación es hidrolizado a 50°C durante 10 minutos. Usando este procedimiento, las proteínas de partida que tienen un grado de hidrólisis de aproximadamente cero pueden ser usadas.

Básicamente, todos los parámetros antes mencionados son variables. Así, la temperatura del paso de hidrólisis puede ser, en general, 5-70°C con temperatura de 40-60°C, especialmente 50°C siendo la preferida. La duración de la hidrólisis puede variar entre 1 y 300 minutos y es preferiblemente 5-10 minutos. La cantidad de enzima adicionada puede variar entre alrededor de 0.01-10% en peso. Cuando la hidrólisis es llevada a cabo en un procedimiento de dos pasos, la cantidad de enzima usada en el primer paso es preferiblemente 1% en peso y en el segundo paso 2% en peso (basado en la masa seca de la proteína).

La inactivación de la proteasa puede ser efectuada por desnaturalización con calor, por ejemplo, calentando a 80-85°C durante 5-10 minutos. Subsiguientemente, el producto puede ser sometido al fraccionamiento, por ejemplo, por centrifugación o ultra filtración para separar y aislar la proteína del lupin modificada.

La solución o suspensión de la proteína del lupin modificada así obtenida es entonces convertida a una forma sólida, por ejemplo un polvo seco, por ejemplo, por secado por rociado o enfriado por rociado.

Antes del secado, las fracciones de la proteína del lupin modificada pueden ser sometidas al tratamiento con calor (Pasteurización) por ejemplo calentando a 80-85°C durante 5-10 minutos para estabilizar el producto contra el deterioro microbiano.

Aún en otro aspecto la presente invención se relaciona con las proteínas del lupin modificadas las que son obtenibles por el proceso de la presente invención, y con composiciones que comprenden tales proteínas del lupin modificadas y un colorante o ingrediente activo soluble en la grasa, y, opcionalmente, adyuvantes y/o excipientes.

La proteína del lupin modificada es un polipéptido dispersable o soluble en agua o que ejerce un rol protector hacia la fase interna de la dispersión es decir el colorante o el ingrediente activo soluble en la grasa y, por lo tanto, actúa como un hidrocoloide protector. Como regla el hidrocoloide caracteriza la actividad de la superficie e imparte viscosidad, en virtud de la cual la misma estabiliza las emulsiones o suspensiones en las cuales está presente con el colorante o el ingrediente activo soluble en la grasa.

Las composiciones de la presente invención son preferiblemente composiciones en polvo, sólidas donde el contenido de colorante o del ingrediente activo soluble en la grasa es finamente dispersado en una matriz o portador. La matriz o portador contiene o consiste de la proteína del lupin modificada como un hidrocoloide protector y, opcionalmente, uno o más excipientes solubles en agua y/o adyuvantes convencionalmente usados para la formulación de los colorantes o ingredientes activos solubles en la grasa.

En las composiciones de la presente invención, la cantidad de proteína del lupin modificada está desde alrededor de 0.5 a alrededor de 60.0% en peso y la cantidad de colorante y/o de ingrediente activo soluble en la grasa es desde alrededor de 0.1 a alrededor de 80.0% en peso en base al peso total de la composición, todos los componentes totalizando 100%.

De manera apropiada, las composiciones de la presente invención (además) contienen uno o más excipientes y/o adyuvantes seleccionados de uno o más de un mono- di-, oligo- y polisacáridos, glicerol, triglicéridos, antioxidantes solubles en agua y antioxidantes solubles en la grasa. Las composiciones sólidas pueden en adición contener un agente anti-torta, tal como el ácido silícico, y hasta alrededor de 10% en peso, como regla alrededor de 2 a 5% en peso, de agua.

ES 2 286 460 T3

Ejemplos de mono- y disacáridos que pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención son la sucrosa, el azúcar invertida, la glucosa, la fructosa, la lactosa, la maltosa, la sacarosa y los alcoholes de azúcar, y ejemplos de los oligo- y polisacáridos son el almidón y los hidrolizados de almidón, por ejemplo las dextrinas y maltodextrinas, especialmente aquellas que tienen el rango de 5 - 65 equivalentes de dextrosa (DE), y el sirope de glucosa, especialmente aquellos que tienen el rango de 20 - 95 DE. El término "equivalentes de dextrosa" (DE) denota el grado de hidrolización y es una medida de la cantidad del azúcar reductora calculado como D-glucosa en base al peso seco; la escala está basada en el almidón original que tiene un DE cercano a 0 y glucosa que tiene un DE de 100.

El triglicérido es apropiadamente un aceite vegetal o grasa, preferiblemente aceite de maíz, aceite de girasol, aceite de soya, aceite de cártamo, aceite de semilla de colza, aceite de cacahuete, aceite de palma, aceite de la almendra de la palma, aceite de la semilla del algodón o aceite de coco.

El solvente orgánico puede ser por ejemplo cloruro de metileno, cloroformo, etil acetato, dimetil éter, acetona, etanol o isopropanol.

El antioxidante soluble en agua puede ser por ejemplo el ácido ascórbico o una sal del mismo, preferiblemente el ascorbato de sodio. El antioxidante soluble en grasa puede ser por ejemplo un tocoferol, por ejemplo el dl- α -tocopherol (es decir, tocoferol sintético), el d- α -tocopherol (es decir, tocoferol natural), el β - o γ -tocopherol, o una mezcla de dos o más de estos; el hidroxitolueno butilado (BHT); el hidroxianisol butilado (BHA); el etoxiquin, el propil galato; el tert. butil hidroxiquinolina; o un éster de ácido ascórbico de un ácido graso, preferiblemente el ascorbil palmitato o el estearato. Dependiendo del pH de la solución de la matriz acuosa del éster de ácido ascórbico de un ácido graso, particularmente el ascorbil palmitato o el estearato, pueden alternativamente ser adicionados a la fase agua.

Las composiciones de la presente invención pueden ser composiciones sólidas, es decir, polvos dispersables o solubles en agua, estables, o pueden ser composiciones líquidas, es decir soluciones coloidales acuosas o dispersiones aceite-en-agua de los polvos antes mencionados. Las dispersiones aceite-en-agua estabilizadas, que pueden ser emulsiones aceite-en-agua o pueden caracterizar una mezcla de partículas suspendidas, es decir, sólidas, y goticas emulsificadas, es decir líquidas, pueden ser preparadas por los métodos ya descritos anteriormente.

Típicamente, una composición en polvo de acuerdo a la presente invención comprende

- alrededor de 0.5 a alrededor de 60% en peso, preferiblemente alrededor de 5 a alrededor de 50% en peso de una proteína del lupin modificada;
- alrededor de 0.1 a alrededor de 80% en peso preferiblemente alrededor de 0.5 a alrededor de 60% en peso de un colorante y/o un ingrediente activo soluble en grasa;
- 0 a alrededor de 70% en peso preferiblemente alrededor de 0 a alrededor de 40% en peso de un mono- o disacárido;
- 0 a alrededor de 70% en peso preferiblemente alrededor de 0 a alrededor de 40% en peso de un hidrolizado de almidón;
- 0 a alrededor de 20% en peso preferiblemente alrededor de 0 a alrededor de 10% en peso de glicerol;
- 0 a alrededor de 50% en peso preferiblemente alrededor 0 a alrededor de 30% en peso de un triglicérido;
- 0 a alrededor de 5% preferiblemente alrededor de 0 a alrededor de 2% en peso de uno o más antioxidante(s) soluble(s) en agua;
- 0 a alrededor de 5% preferiblemente alrededor de 0 a alrededor de 2% en peso de uno o más antioxidante(s) soluble(s) en la grasa;
- 0 a alrededor de 50% en peso preferiblemente alrededor de 0 a alrededor de 35% en peso de un almidón;
- 0 a alrededor de 5% en peso preferiblemente alrededor de 1% en peso de ácido silícico; y
- 0 a alrededor de 10% en peso preferiblemente alrededor de 1 a alrededor de 5% en peso de agua;

los porcentajes de todos los ingredientes totalizando 100.

Las nuevas composiciones de esta invención pueden ser usadas para la coloración y/o para el enriquecimiento o fortificación de alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos.

Mediante la presente invención se proporcionan preferiblemente composiciones que comprenden β -caroteno como un agente colorante. Estas composiciones, cuando se disuelven, dispersan o diluyen en/con agua para una concentración de β -caroteno final de 10 ppm son típicamente caracterizadas por espectroscopia ultravioleta/visible usando agua des-ionizada como referencia. Para un espesor muestra de 1 cm las dispersiones muestran una extinción de al menos

0.6 (preferiblemente alrededor de 1.0) unidades de absorbancia a la longitud de onda de máxima densidad óptica en el rango de 400 a 600 nm. Esto es equivalente a un coeficiente de extinción formal de β -caroteno en dispersión acuosa E (1%, 1 cm) de 600 (preferiblemente >1000).

5 La fabricación de las composiciones de la presente invención puede ser llevada a cabo de una manera conocida *per se* para la preparación de composiciones basadas en una matriz de composiciones colorantes o activas solubles en la grasa para la coloración y/o para el enriquecimiento o fortificación de alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos, por ejemplo como es descrito en las Publicaciones de Patentes Europeas Nos. 0 285 682, 0 347 751, 0 966 889, 1 066 761 y 1 106 174, en la Publicación PCT No. WO 98/15195 y en la Solicitud de Patente
10 Suiza No. 1238/92, los contenidos de las cuales son incorporados aquí como referencia.

Así, las composiciones de la presente invención pueden ser preparadas por un proceso que comprende homogeneizar, en una solución acuosa o coloidal de la proteína del lupin modificada y opcionalmente uno o más excipientes y/o adyuvantes solubles en agua, un colorante o ingrediente activo soluble en la grasa o una solución o dispersión del colorante o compuesto activo soluble en la grasa y opcionalmente uno o más excipientes y/o adyuvantes solubles en la grasa, y convertir la dispersión así obtenida en una composición sólida.

Típicamente, la proteína del lupin modificada y, los excipientes y adyuvantes opcionales solubles en agua son disueltos o dispersos en agua. El colorante y/o compuesto activo soluble en la grasa, los excipientes y adyuvantes opcionales solubles en la grasa son usados como tal o disueltos o suspendidos en un triglicérido y/o un solvente orgánico. El colorante y/o ingrediente activo soluble en la grasa o la solución o dispersión de los mismos, respectivamente, es entonces adicionado a la solución de la proteína acuosa con agitación y la mezcla homogenizada usando tecnología convencional. La dispersión aceite-en-agua así obtenida puede, después de la eliminación del solvente orgánico (si está presente), ser convertida en una composición sólida, por ejemplo un polvo seco.

Un objetivo adicional de la invención es un proceso para la preparación de las composiciones basadas en una proteína del lupin modificada como se describió con más detalles anteriormente cuyo proceso comprende homogeneizar, en una solución acuosa o solución coloidal de la proteína del lupin modificada y excipientes y adyuvantes opcionales solubles en agua, una solución o dispersión del colorante y/o del ingrediente activo soluble en la grasa y/o adyuvantes opcionales solubles en la grasa, si se requiere, convertir la dispersión obtenida en un polvo.

Para la homogenización pueden ser aplicadas las tecnologías convencionales, tales como la homogenización a alta presión, emulsificación con alto corte (sistemas rotor-estator), micronización o molido en húmedo. Otras técnicas usadas para la preparación de composiciones de colorante o de ingredientes activos solubles en la grasa para la coloración y/o para el enriquecimiento o fortificación de alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos son descritas en las Publicaciones de Patentes Europeas Nos. 937412 y 1008380 y en la Especificación de la Patente de los Estados Unidos No. 6,093,348, los contenidos de las cuales son incorporados aquí como referencia.

La dispersión así obtenida, la cual es una dispersión aceite-en-agua, puede ser convertida en una composición sólida, por ejemplo un polvo seco, usando cualquier tecnología convencional tal como el secado por rociado, el secado por rociado en combinación con la granulación en lecho fluidizado (la última técnica comúnmente conocida como secado por rociado fluidizado o FSD), o por una técnica de captura de polvo donde las gotitas de la emulsión rociada son atrapadas en un lecho de un absorbente, tal como almidón, y subsiguientemente secadas.

Las bebidas donde las formas del producto de la presente invención pueden ser usadas como un colorante o un ingrediente funcional pueden ser bebidas carbonatadas por ejemplo, aguas de seltz saborizadas, bebidas con sales o bebidas minerales, así como bebidas no carbonatadas por ejemplo aguas saborizadas, jugos de frutas, ponches de frutas y formas concentradas de estas bebidas. Las mismas pueden estar basadas en jugos de frutas o vegetales naturales o en sabores artificiales. También son incluidas las bebidas alcohólicas y los polvos para bebidas instantáneas. Además, las bebidas que contienen azúcar, bebidas dietéticas con edulcorantes artificiales no-calóricos son también incluidas.

Adicionalmente, los productos lácteos, obtenidos de fuentes naturales o sintéticas, están dentro del alcance de los productos alimenticios donde las formas del producto de la presente invención pueden ser usadas como un colorante o como un ingrediente funcional. Ejemplos típicos de tales productos son las bebidas de leche, el helado, el queso, el yogurt y similares. Los productos que reemplazan la leche como las bebidas de leche de soja y los productos tofu están también comprendidos dentro de este rango de aplicación.

También incluidos están los dulces que contienen las formas del producto de la presente invención como un colorante o como un ingrediente funcional, tal como productos de confitería, bombones, gomas, postres, por ejemplo helado, jaleas, pudines, polvos para pudines instantáneos y similares.

También incluidos están los cereales, bocadillos, pastelitos, pasta, sopas y salsas, mayonesa, aliños para ensaladas y similares que contienen las formas del producto de la presente invención como un colorante o un ingrediente funcional. Por otra parte, las preparaciones de frutas usadas para los lácteos y cereales están también incluidas.

La concentración final del ingrediente activo o el colorante que es adicionado por medio de las formas del producto de la presente invención a los productos alimenticios puede ser desde alrededor de 0.1 a alrededor de 500 ppm, particularmente desde alrededor de 1 a alrededor de 50 ppm en base al peso total de la composición alimenticia y

dependiendo del producto alimenticio particular a ser coloreado o fortificado y el grado de coloración o fortificación pretendido.

Las composiciones alimenticias de esta invención son preferiblemente obtenidas adicionando al producto alimenticio el ingrediente activo o el colorante en la forma de una composición de esta invención. Para la coloración o fortificación de un producto alimenticio o farmacéutico una composición de esta invención puede ser usada de acuerdo a los métodos conocidos *per se* para la aplicación de las formas de productos sólidos dispersables en agua.

En general la composición puede ser adicionada tanto como una solución de almacenamiento acuosa, una mezcla de polvo seco o una pre-mezcla con otros ingredientes alimenticios apropiados de acuerdo a la aplicación específica. El mezclado puede ser hecho por ejemplo usando un mezclador de polvo seco, un mezclador de bajo corte, un homogenizador de alta presión o un mezclador de alto corte dependiendo de la formulación de la aplicación final. Como será fácilmente aparente tales técnicas están dentro de la habilidad del experto.

Las composiciones farmacéuticas tales como tabletas o cápsulas donde las composiciones son usadas como un colorante están también dentro del alcance de la presente invención. La coloración de las tabletas puede ser realizada adicionando las formas del producto en forma de una composición de colorante líquida o sólida separadamente a la mezcla de recubrimiento de la tableta o por adición de una composición colorante a uno de los componentes de la mezcla de recubrimiento de la tableta. Las cápsulas de capa blanda o dura coloreadas pueden ser preparadas incorporando una composición colorante en la solución acuosa de la masa de las cápsulas.

Las composiciones farmacéuticas tales como tabletas del tipo tabletas masticables, tabletas efervescentes o tabletas recubiertas con una película o las cápsulas como las cápsulas de capa dura donde las composiciones son usadas como un ingrediente activo están también dentro del alcance de la presente invención. Las formas del producto son típicamente adicionadas como polvos a la mezcla de la tableta o rellenas en las cápsulas de una manera conocida *per se* para la producción de cápsulas.

Los productos alimenticios animales tales como las premezclas, alimentos compuestos, sustitutos de la leche, preparaciones alimenticias o de dieta líquidas donde las composiciones son usadas como un colorante para la pigmentación por ejemplo de la yema del huevo, aves de mesa, animales acuáticos o de asar a la parrilla o como un ingrediente activo están también dentro del alcance de la presente invención.

Los productos cosméticos, de tocador y dérmicos es decir productos para el cuidado de la piel y el cabello tal como cremas, lociones, baños, lápices labiales, champú, acondicionadores, atomizadores o geles donde las composiciones son usadas como un colorante o como un ingrediente activo están también dentro del alcance de la presente invención.

Para la producción de las formas del producto líquidas y sólidas tal como las suspensiones aceite-en-agua, emulsiones aceite-en-agua o polvos los hidrocoloides usados aquí actúan como ingredientes multi-funcionales. Para este propósito los hidrocoloides deben mostrar un espectro de propiedades funcionales tales como propiedades de estabilización en dispersión excelentes, alta capacidad y eficiencia de emulsificación (la última siendo relevante con respecto a la distribución del tamaño de partículas de la fase interna de la dispersión), alta solubilidad y buena viscosidad adaptada en solución acuosa, estabilidad térmica, baja susceptibilidad al pH, carga y fortaleza del ión, formación de película superior así como propiedades de barrera al vapor de gas y agua aceptables en las formas del producto sólido.

Las proteínas del lupin originales son comercialmente de fácil disponibilidad en forma de harinas o concentrados de proteínas tal como un producto Vitaprot Tipo LP 60 de J. Rettenmaier & Sons.

Los pasos usados para la modificación de la proteína del lupin aislada descritos anteriormente conducen a propiedades funcionales generales mejoradas de la proteína tales como mejores propiedades emulsionantes, generalmente mayor solubilidad en solución acuosa por ejemplo menos susceptibilidad al pH y contra iones así como mejor solubilidad en agua fría, mejor resistencia a la temperatura, y mejores propiedades de formación de película. Además la viscosidad en solución acuosa es disminuida significativamente y está ahora en un rango aceptable para los propósitos de la corriente invención.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención adicionalmente

Ejemplo 1

Una suspensión acuosa de la proteína del lupin natural es preparada mediante extracción acuosa de la semilla del lupin desengrasada a pH 4-5 y la subsiguiente extracción de la proteína a pH 6-8. La suspensión acuosa de la proteína del lupin natural tiene un contenido de materia seca de 4% en peso la materia seca teniendo un contenido de proteína > 90%. El pH de la suspensión en entonces ajustado a pH 7 y a una temperatura de 50°C. Luego, son adicionados 0,5% en peso de Alcalase 2.4 L (Novozymes). Durante la hidrólisis enzimática el pH es mantenido constante con la adición de una solución de NaOH 1 M y la temperatura es mantenida a 50°C. Después de 5-10 minutos la proteasa es inactivada calentando la suspensión a 80°C durante 10 minutos. Luego la fracción insoluble es separada y la solución es secada por rociado a una temperatura del producto de 70-80°C.

ES 2 286 460 T3

Ejemplo 2

(Ejemplo de comparación)

- 5 Una suspensión acuosa de la proteína del lupin natural es preparada mediante extracción acuosa de la semilla del lupin desengrasada a pH 4-5 (la fracción soluble representando el pre-extracto) y la extracción subsiguiente de la proteína a pH 6-8. La suspensión acuosa de la proteína del lupin natural tiene un contenido de materia seca de 4% en peso la materia seca teniendo un contenido de proteína > 90%. La suspensión es ajustada a pH 4-5 y la fracción insoluble es separada por centrifugación. El sobre-nadante es combinado con el pre-extracto ácido y la solución
10 combinada es purificada por ultra filtración. De esta forma, los componentes de la proteína soluble del pre-extracto ácido y las proteínas solubles del extracto de proteína acidificado en el retenido son obtenidos. El retenido de la ultra filtración es secado por rociado a una temperatura del producto de 70-80°C.

Ejemplo 3

- 15 Una composición que comprende proteína del lupin modificada y vitamina A es preparada como sigue:

a) Preparación de la solución A (acuosa)

- 20 Una premezcla seca de 34.1 g de proteína del lupin L143T modificada (preparada a partir de L. albus Typ Top de acuerdo al Ejemplo 1 y referida en lo adelante como L143T) y 51.2 g de sirope de glucosa secado Glucidex IT 47 (Roquette Frères, F-Lestrem) fue preparada y subsiguientemente mezclada con 120 ml de agua des-ionizada en un recipiente de reacción de 1 l a temperatura ambiente. La mezcla fue calentada a 45°C y agitada durante alrededor de 15 minutos a 45°C. El pH era de alrededor de 6.1.

- 25 b) Preparación de la solución B (en base aceite)

- 15.3 g de acetato de vitamina A cristalino, 2.7 g de aceite de cacahuete y 1.3 g de dl- α -tocopherol fueron introducidos en un frasco Erlenmeyer de 100 ml. Una barra de agitación magnética fue adicionada a la mezcla. Mientras se agitaba, la mezcla fue calentada a 65°C en 10 minutos.

c) Preparación de una emulsión a partir de las soluciones A y B

- 35 La solución A fue llevada a 50°C y mientras se agitaba vigorosamente, la solución B fue adicionada a la solución A en 3 minutos y la dispersión fue vigorosamente agitada durante otros 20 minutos a 50°C. La emulsión fue calentada a 60°C y agitada durante 5 horas para investigar su estabilidad física a largo término. Después del tiempo de mantenimiento el tamaño de partículas principal de la fase interna de la emulsión fue 388 nm medido por espectroscopia de correlación de fotones (Coulter N4 Plus).

- 40 d) Preparación de la composición sólida a partir de la emulsión

- La emulsión fue rociada en un lecho fluidizado pre-enfriado de almidón de maíz. El exceso de almidón de maíz fue eliminado por tamizado y el polvo obtenido fue secado en una corriente de aire a temperatura ambiente durante alrededor de 2 horas. La fracción de partículas de polvo (126.5 g) en el rango de 0.16-0.50 mm fue recogida por
45 tamizado y caracterizada con respecto al contenido de vitamina A, contaminación con aceite de la superficie, contenido de almidón de maíz y humedad residual. El polvo obtenido tuvo un contenido de vitamina A de 263'000 IU/g medido por análisis de HPLC. La contaminación con aceite de la superficie fue de 0.2% del contenido de vitamina A. El polvo tuvo un contenido de almidón de maíz de 24.4% y un contenido de agua residual de 6.6%.

Ejemplo 4

Una composición que comprende la proteína del lupin modificada y vitamina E es preparada como sigue:

a) Preparación de la solución A (en base aceite)

- 55 26.7 g de dl- α -tocoferil acetato fueron introducidos en un frasco Erlenmeyer de 100 ml. Una barra de agitación magnética fue adicionada y el dl- α -tocoferil acetato fue calentado a 75°C.

b) Preparación de la solución B (acuosa)

- 60 Una premezcla seca de 40.0 g de proteína del lupin L143T modificada fue preparada y subsiguientemente mezclada con 135 ml de agua des-ionizada en un recipiente de reacción de 1 l a temperatura ambiente. La mezcla fue calentada a 50°C y agitada durante alrededor de 15 minutos a 50°C. El pH era de alrededor de 6.1.

- 65 c) Preparación de una emulsión a partir de las soluciones A y B

La solución B fue llevada a 55°C y mientras se agitada vigorosamente la solución A fue adicionada a la solución B y la emulsión fue vigorosamente agitada durante otros 30 minutos a 55°C. La emulsión fue calentada a 60°C y

ES 2 286 460 T3

agitada durante 5 horas para investigar su estabilidad física a largo término. Después del tiempo de mantenimiento el tamaño de partículas principal de la fase interna de la emulsión fue 521 nm medido por espectroscopia de correlación de fotones (Coulter N4 Plus).

5 d) Preparación de la composición sólida a partir de la emulsión

La emulsión fue diluida con agua des-ionizada para un contenido de agua final de 65% y luego secada por rociado con un Mobile Minor (NiroA/S). La temperatura de entrada del aire de secado fue 220°C la temperatura de salida fue 110°C. El polvo fue recogido y fue adicionado alrededor de 1% de dióxido de silicio. El contenido de tocoferil acetato del polvo fue 25.6% medido por HPLC.

Ejemplo 5

Una composición que comprende la proteína del lupin modificada y β -caroteno es preparada como sigue:

15 a) Preparación de la solución A (en base aceite)

8.8 g de aceite de maíz y 1.6 g de dl- α -tocoferol fueron introducidos en un frasco Erlenmeyer de 500 ml. 18.4 g de β -caroteno cristalino fueron dispersados en 206 ml de tricloro metano y la dispersión obtenida fue adicionada al aceite de maíz y al tocoferol. Una barra de agitación magnética fue adicionada a la mezcla y un condensador de reflujo fue ajustado al frasco Erlenmeyer. Agitando suavemente y, al mismo tiempo, calentando la mezcla a alrededor de 65°C se obtuvo una solución.

25 b) Preparación de la solución B (acuosa)

Una premezcla seca de 48.0 g de proteína del lupin L140T-2 (preparada a partir de *L. angustifolius* de acuerdo al Ejemplo 1 y referida en lo adelante como L140T-2) y 40.8 g de sucrosa y 2.4 g de ascorbil palmitato fue preparada y subsiguientemente mezclada con 140 ml de agua des-ionizada en un recipiente de reacción de 1 l a temperatura ambiente. Mientras se agitaba la mezcla fue calentada a 35°C y la adición de 14 ml de una solución de hidróxido de sodio 1 N el pH de la mezcla fue llevado a 7.9. Subsiguientemente, la mezcla fue vigorosamente agitada por un corto período de tiempo para alcanzar una solución homogénea.

c) Preparación de la emulsión a partir de las soluciones A y B

Mientras se agitaba vigorosamente, la solución A fue adicionada a la solución B a 35°C y la dispersión fue vigorosamente agitada durante otros 30 minutos. El recipiente de reacción fue inundado con nitrógeno y la dispersión fue calentada a 55°C. La dispersión agitada fue mantenida a 55°C durante 60 minutos. El tricloro metano residual fue eliminado a 50-55°C usando un evaporador rotatorio. Después de eliminar las burbujas de aire atrapadas por centrifugación la emulsión fue suavemente agitada a 50-55°C durante algunos minutos y luego caracterizada con respecto al tamaño de partículas de la fase interna. El tamaño de partículas principal de la fase interna de la emulsión fue 148 nm, medido por espectroscopia de correlación de fotones (Coulter N4 Plus).

d) Preparación de la composición sólida a partir de la emulsión

La emulsión fue rociada en un lecho fluidizado pre-enfriado de almidón de maíz. El exceso de almidón de maíz fue eliminado mediante tamizado y el polvo obtenido fue secado en una corriente de aire a temperatura ambiente durante alrededor de 2 horas. La fracción de partículas de polvo (aprox. 138 g) en el rango de 0.16-0.63 mm fue recogida por tamizado y caracterizada con respecto al contenido de carotenoides, intensidad del color y matriz de color en dispersión acuosa, contenido de almidón de maíz y humedad residual.

El polvo obtenido tuvo un contenido de β -caroteno de 12.8% (11.5%), medido por espectroscopia UV/VIS (HPLC), un contenido de 25% de almidón de maíz y un contenido de agua residual de 5.9%. Fue dispersado en agua des-ionizada y la extinción fue medida en una celda de precisión de cuarzo de 1 cm contra el agua des-ionizada. Para una dispersión de 10 ppm de β -caroteno una extinción de 1.130 a una longitud de onda de 481 nm fue calculada [E(1%,1 cm) = 1130]. Los valores de color $L^*=81.9$, $a^*=22.6$ y $b^*=31.6$ fueron medidos de acuerdo al sistema CIE para una dispersión de 5 ppm de β -caroteno con un Espectro colorímetro Ultrascan Hunterlab (1 cm, TTRAN). Basado en los valores de a^* y b^* un ángulo de matriz de color $h^*=54.4^\circ$ a una saturación (valor croma) $C^*=38.8$ puede ser calculado.

Ejemplo 6

Una composición que comprende la proteína del lupin modificada y β -caroteno es preparada como sigue:

El procedimiento de acuerdo al Ejemplo 5 fue llevado a cabo usando proteína del lupin modificada L143T.

El polvo obtenido tuvo un contenido de β -caroteno de 14.2% (12.4%), medido por espectroscopia UV/VIS (HPLC), un contenido de 20% de almidón de maíz y un contenido de agua residual de 5.5%. Fue dispersada en agua des-ionizada y la extinción fue medida en una celda de precisión de cuarzo de 1 cm contra agua des-ionizada. Para una dispersión de 10 ppm de β -caroteno una extinción de 0.892 a una longitud de onda de 478 nm fue calculada [E(1%,1

ES 2 286 460 T3

cm) = 892]. Los valores de color $L^*=84.1$, $a^*=16.8$ y $b^*=27.4$ fueron medidos de acuerdo al sistema CIE para una dispersión de 5 ppm de β -caroteno con un Espectro colorímetro Ultrascan Hunterlab (1 cm, TTRAN). Basado en los valores de a^* y b^* un ángulo de matriz de color $h^*=58.5^\circ$ a una saturación (valor croma) $C^*=32.1$ puede ser calculado.

5 Ejemplo 7

Una composición que comprende la proteína del lupin modificada y β -caroteno es preparada como sigue:

10 a) Preparación de la solución A (acuosa)

60 g de proteína del lupin modificada L143T fueron disueltos en 400 ml de agua des-ionizada a 50°C . Una premezcla seca consistente de 64.5 g de sucrosa, 121.8 g de una maltodextrina (DE 20-23) y 3.0 g de ascorbato de sodio fue preparada y adicionada a la solución de la proteína acuosa a 50°C (= solución A).

15 b) Preparación de la solución B (en base aceite)

46.5 g de un triglicérido (Durkex 500: aceite de frijol de soya parcialmente hidrogenado) y 0.3 g de dl- α -tocoferol fueron mezclados y calentados a 170°C . Subsiguientemente, 3.75 g de β -caroteno fueron suspendidos en la mezcla de triglicérido y tocoferol. Agitando durante alrededor de 10 minutos una solución clara de β -caroteno fue obtenida (= solución B).

20 c) Preparación de la emulsión a partir de las soluciones A y B

Una emulsión cruda fue preparada adicionando la solución B a la solución A mientras se agitaba suavemente. Una fina emulsión fue obtenida mediante un tratamiento de homogenización a alta presión de cuatro pasajes de la pre-emulsión a una presión de 50/400 bar (LAB 1000 de APV).

d) Preparación de la composición sólida a partir de la emulsión

30 La emulsión fue secada por rociado en un secador por rociado de laboratorio (Mobile Minor de Niro) a una temperatura de entrada de 190°C y una temperatura de salida de 83°C . Un polvo fino fue obtenido con un contenido de agua residual de 1.8%. El contenido de β -caroteno del polvo fue 1.3% medido por espectroscopia UV/VIS y HPLC. El polvo fue dispersado en agua des-ionizada y la extinción fue medida en una celda de precisión de cuarzo de 1 cm contra el agua. Para una dispersión de 10 ppm de β -caroteno y extinción de 1.895 a una longitud de onda de 463 nm fue calculada $[E(1\%, 1\text{ cm}) = 1895]$. Los valores de color $L^*=85.0$, $a^*=9.0$ y $b^*=63.9$ fueron medidos de acuerdo al sistema CIE para una dispersión de 5 ppm de β -caroteno con un Espectro colorímetro Ultrascan Hunterlab (1 cm, TTRAN). Basado en los valores de a^* y b^* un ángulo de matriz de color $h^*=82.0^\circ$ a una saturación (valor croma) $C^*=64.5$ puede ser calculado.

40 Ejemplo 8

Una formulación de Bebida Suave con β -caroteno 6 ppm puede preparada como sigue:

Fórmula

Ingredientes	[g]
Siropo de Azúcar 64° Brix	156.2
Benzoato de Na	0.2
Acido ascórbico	0.2
Acido cítrico (como solución acusa 50% p/p	5.0
Saborizante *)	0.5
β -caroteno 10% como una solución de almacenamiento al 1% **)	6.0
Agua	a 1000.0

*) Sabor Melocotón No. 78511-76 de Givaudan

**) es decir, una solución acuosa al 1% (dispersión) de formulaciones como las obtenidas por ejemplo en el Ejemplo 3 o 4, en base a un contenido de β -caroteno de 10% en dicha formulación

ES 2 286 460 T3

Procedimiento

Disolver el benzoato de Na en parte del agua, adicionar el sirope de azúcar, ácido ascórbico, ácido cítrico y saborizante y finalmente la solución de almacenamiento de β -caroteno. Diluir el sirope embotellado en un litro de bebida.

El β -caroteno proporciona un color naranja intenso de una alta claridad y con una alta fortaleza del color. Pruebas de estabilidad a largo término de tres meses en condiciones ambientales mostraron una buena estabilidad física del β -caroteno en bebidas y una buena estabilidad de color en términos de valores de color $L^*C^*h^*$.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la fabricación de una proteína del lupin modificada, el cual comprende ajustar una solución o suspensión acuosa de las proteínas del lupin de origen natural teniendo un contenido de masa seca de desde 0,1 a 20% a pH 3 a 9, adicionar 0,01 a 10% en peso de una proteasa, con relación al peso seco de la proteína del lupin, incubar la solución o suspensión de proteína a una temperatura de desde 5 a 70°C hasta que un grado de hidrólisis de desde 1 a 30% es obtenido, e inactivar la proteasa.
2. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 1, donde el pH de la solución o suspensión es ajustado a pH 4 a 8, la cantidad de proteasa adicionada es 0,1 a 1%, y la hidrólisis enzimática es efectuada a 20 a 55°C.
3. Un proceso de acuerdo a las reivindicaciones 1 o 2, donde la hidrólisis enzimática es efectuada a un grado de hidrólisis de desde 1 a 10%.
4. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde una proteasa que tiene endo-actividad es usada.
5. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde una proteasa que tiene exo-actividad es usada.
6. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde una proteasa de bacteria o de hongo es usada.
7. Un proceso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proteína del lupin modificada, después que la proteasa ha sido inactivada, es llevada a una forma sólida mediante centrifugación o ultra filtración, opcionalmente después de un paso de fraccionamiento.
8. Proteínas del lupin modificadas obtenibles de acuerdo al proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Composición, que comprende una proteína del lupin modificada de acuerdo a la reivindicación 8, y un colorante o ingrediente activo soluble en la grasa, y, opcionalmente, adyuvantes y/o excipientes.
10. Una composición como la de la reivindicación 9, donde el colorante o ingrediente activo soluble en la grasa es un carotenoide, una vitamina soluble en la grasa, un triglicérido, un filtro UV-A o UV-B soluble en aceite o una mezcla de los mismos.
11. Una composición como la de la reivindicación 10, donde el carotenoide es α - o β -caroteno, 8'-apo- β -carotenal, etil éster de ácido 8'-apo- β -carotenoico, cantaxantina, astaxantina, licopeno, luteína, zeaxantina o crocetina o mezclas de los mismos.
12. Una composición como la de la reivindicación 10, donde la vitamina soluble en la grasa es Vitamina A, D, E o K.
13. Una composición como en cualquiera de las reivindicaciones 8-12 donde al menos uno de mono-, di-, oligo- o polisacárido, un triglicérido, un anti-oxidante soluble en agua, un anti-oxidante soluble en la grasa, ácido silícico y agua está adicionalmente presente.
14. Una composición como la de la reivindicación 13 donde el mono- o disacárido es sacarosa, azúcar invertida, glucosa, fructosa, lactosa o maltosa y la composición opcionalmente contiene glicerol en adición.
15. Una composición como la de la reivindicación 13 donde el polisacárido es un almidón o un hidrolizado de almidón y/o el triglicérido es un aceite vegetal o grasa.
16. Una composición como la de la reivindicación 15 donde el hidrolizado de almidón es una dextrina o una maltodextrina (en el rango de 5-65 equivalentes de dextrosa) o un sirope de glucosa (en el rango de 20-95 equivalentes de dextrosa).
17. Una composición como en cualquiera de las reivindicaciones 9-16 donde la cantidad de la proteína del lupin modificada está desde alrededor de 0.5 a alrededor de 60.0% en peso y la cantidad de colorante o ingrediente activo soluble en la grasa está desde alrededor de 0.1 a alrededor de 80.0% en peso.
18. Un proceso para la preparación de una composición como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 9-17 el cual comprende homogenizar, en una solución acuosa o solución coloidal de la proteína del lupin modificada y excipientes y adyuvantes opcionales solubles en agua, una solución o dispersión del colorante y/o ingrediente activo soluble en la grasa y los adyuvantes opcionales solubles en la grasa, si es requerido, convertir la dispersión obtenida en un polvo.

ES 2 286 460 T3

19. Uso de una composición como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 9-17 para el enriquecimiento, fortificación y/o coloración para alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos.

5 20. Alimentos, bebidas, alimentos animales, cosméticos o medicamentos que contienen una composición como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 9-17.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65