



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 298 071**

② Número de solicitud: 200602713

⑤ Int. Cl.:
A23L 1/305 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
C07K 1/12 (2006.01)
A61K 38/01 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **25.10.2006**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.05.2008**

Fecha de la concesión: **08.07.2009**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **28.07.2009**

⑰ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.07.2009

⑲ Titular/es: **MASTERFARM,S.L.**
c/ dels Blanquers, 85
17820 Banyoles, Girona, ES
QUIMERA INGENIERÍA BIOMÉDICA, S.L.

⑳ Inventor/es: **Agut Sánchez, Julián;**
Fernández Navarro, Carlos;
Juncà Busquets, Josep;
Juncà Riuró, Miquel;
Juncà Riuró, Ferrán;
Espelleta Gil, Gabriel y
Melendo Baños, Jaime

㉑ Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

㉒ Título: **Hidrolizado enzimático de colágeno y procedimiento de obtención.**

㉓ Resumen:

Hidrolizado enzimático de colágeno y procedimiento de obtención.

La invención se refiere a un hidrolizado enzimático de colágeno con un peso molecular comprendido entre 1.000 y 50.000 Daltons, de baja acidez y con una conductividad en solución al 1% en peso no superior a 500 microS/cm.

También se refiere a un procedimiento de obtención de un hidrolizado de colágeno de baja acidez total a partir de tejido dérmico de origen animal, obtenido en condiciones higiénicas, de especies animales aptas para el consumo humano (bovino, porcino, aves y pescado), especialmente apto para la elaboración de productos lácteos que lo contengan. El procedimiento comprende, entre otras, las etapas de: extracción acuosa del subproducto residual; filtración, desmineralización y ultrafiltración de la solución filtrada; hidrólisis enzimática; concentración de la solución de hidrolizado enzimático de colágeno y secado del hidrolizado enzimático de colágeno.

La invención también se refiere a suplementos nutricionales y alimentos funcionales que comprenden el hidrolizado enzimático de colágeno de baja acidez.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Hidrolizado enzimático de colágeno y procedimiento de obtención.

5 Sector técnico de la invención

La presente invención se refiere a un hidrolizado enzimático de colágeno con un peso molecular comprendido entre 1.000 y 50.000 Daltons. Por sus especiales características y condiciones de obtención es especialmente apto para su utilización en la elaboración de productos lácteos.

10 También tiene por objeto un procedimiento de obtención de un hidrolizado de colágeno a partir de tejido dérmico de origen animal, obtenido en condiciones higiénicas, de especies animales aptas para el consumo humano (bovino, porcino, aves y pescado), especialmente apto para la elaboración de productos lácteos que lo contengan. Dichos tejidos pueden ser procesados en su forma nativa, o proceder, como subproductos, de procesos de elaboración de
15 gelatina.

Antecedentes de la invención

20 El colágeno es una molécula de naturaleza proteica, de conformación fibrilar y presente en cantidad variable en todos los tipos de tejido conjuntivo, ya sea piel, músculo, tendones, cartílagos, vasos sanguíneos, ligamentos u otros. El colágeno está compuesto de aminoácidos unidos mediante el enlace peptídico (HN-C=O) formando secuencias de los mismos que definen péptidos de distinto peso molecular y con distintas funciones estructurales en el organismo. En estas secuencias se encuentran todos los aminoácidos esenciales, excepto el triptófano, siendo especialmente abundantes la glicina, la prolina y la hidroxiprolina.

25 Durante mucho tiempo el modo habitual de obtención de colágeno se ha llevado a cabo por dos vías. La primera vía consiste en la extracción directa de tejidos ricos en colágeno, tal como piel, huesos y cartílagos mediante la hidrólisis directa con enzimas proteolíticas, seguida de múltiples etapas de purificación, hasta llegar a un producto final que se somete a secado. Mediante esta primera vía se obtienen productos de color claro y con olor y sabor suaves. Sin
30 embargo, el coste de obtención del hidrolizado de colágeno obtenible por esta vía resulta muy elevado, lo que limita mucho sus aplicaciones.

35 Según otra vía alternativa, el hidrolizado de colágeno se obtiene a partir de métodos de extracción en ausencia de enzimas mediante hidrólisis en medios ácido o básico partiendo de piel, huesos y/o cartílagos de los que previamente ya se han extraído en medio acuoso las gelatinas (productos de valor más elevado en el mercado, empleados en alimentación e industria farmacéutica principalmente). Los hidrolizados de colágeno así obtenidos presentan pesos moleculares irregulares, sabor y olor desagradables, color oscuro y niveles apreciables de aminas biógenas como cadaverina o putrescina. El coste de obtención de hidrolizado de colágeno por esta segunda vía es más bajo, pero lamentablemente, debido a las deficientes características organolépticas del hidrolizado obtenido, el campo de aplicación
40 del mismo es bastante limitado.

Otro de los inconvenientes de las vías habituales de obtención de hidrolizado de colágeno es que, en ambos casos, la riqueza en colágeno del producto obtenido es inferior al 98% sobre producto seco, lo que las hace en general poco rentables. Además, tomando en consideración las fuentes de suministro utilizadas, preferentemente pieles de bóvidos
45 y de pescado, resulta muy habitual que el hidrolizado quede contaminado con impurezas y agentes no convencionales o contaminantes.

Sin embargo, los hidrolizados de colágeno se emplean ampliamente en muchos y variados campos, por ejemplo en el campo de la cosmética, en la industria del papel, en la industria alimentaria o en la industria farmacéutica. En el caso
50 de la industria farmacéutica y de la alimentaria se requiere que el hidrolizado de colágeno sea lo más puro posible, lo que, como ya se ha comentado antes, encarece notablemente el proceso de obtención. En el caso particular de la utilización de hidrolizado de colágeno en la industria láctea, la situación es más desfavorable, debido a la sensibilidad de la estabilidad de la leche a cambios de salinidad, pH, acidez y otros parámetros.

55 Los investigadores han desarrollado con anterioridad un procedimiento según el cual, a partir de subproductos de procesos de obtención de gelatina, se obtiene un hidrolizado enzimático de colágeno muy puro y aplicable tanto en la fabricación de alimentos funcionales como en suplementos nutricionales, permitiendo una mejora de la capacidad funcional y/o la calidad de vida de un mamífero con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares. Sin embargo, cuando dichos hidrolizados enzimáticos de colágeno deben emplearse en la fabricación de
60 productos lácteos (leche, yogures, quesos, etc.), debido a la acidez y/o salinidad de los mismos, aparecen problemas para obtener productos con la consistencia adecuada, por ejemplo problemas de precipitación en medio ácido de las proteínas de la leche, o problemas de incompatibilidad con los otros ingredientes del suplemento nutricional o alimento funcional.

65 Hasta la fecha, si se quería obtener un hidrolizado enzimático de colágeno con baja acidez, los mismos quedaban supeditados a unos pesos moleculares muy elevados, que no los hacían adecuados para la preparación de estos productos lácteos, principalmente debido a su gran viscosidad.

Concretamente, los hidrolizados de colágeno habituales, por el propio procedimiento de obtención de los mismos en que se van hidrolizando las moléculas proteicas, liberándose los extremos ácidos de los aminoácidos que las integran, presentan niveles de acidez tan altos que resultan incompatibles con la pasteurización de mezclas de éstos con leche o derivados lácteos, a las concentraciones que deben emplearse para la fabricación de dichas mezclas, estando dichas concentraciones comprendidas entre el 2% y el 15% en peso de hidrolizado respecto del peso total de la mezcla.

En anteriores investigaciones, y de acuerdo con la patente US 6,211,143, ya se había conseguido demostrar con hidrolizados de gelatina de menor pureza en colágeno y con pesos moleculares mayores (hasta 100.0000 daltons) que la ingesta del mismo por deportistas y personas con un esfuerzo especial en sus actividades normales conseguían mantener o mejorar la integridad de los cartílagos articulares.

De la patente ES 2087030 se deduce que el hidrolizado de gelatina también es útil como coadyuvante en los tratamientos destinados a compensar el déficit de calcio.

También se deduce otra aplicación de la patente ES 2104507, donde se describen composiciones para la preparación de medicamentos para el tratamiento y prevención de la displasia de cadera en perros.

Varios estudios realizados recientemente han demostrado que el hidrolizado enzimático de colágeno es bien absorbido cuando se administra por vía oral y se distribuye con gran afinidad, preferentemente en los tejidos de los cartílagos articulares (Oesser S, *et al.* "Oral administration of ¹⁴C Labelled Gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL)". *J Nutr* 1999; **129**: 1891-1895.). Este espectro de distribución provoca un incremento del volumen de la masa cartilaginosa, la cual puede desarrollar su acción, con la consecuente disminución del dolor y de la inflamación y con la mejoría de la motilidad de las citadas articulaciones. En este aspecto se remite el lector a las siguientes publicaciones: Adam M. "Therapie der osteoarthritis. Welche Wirkung haben gelatinepräparate" *Therapiewoche* 1991, **41**: 2458-2461; Arquer A, *et al.* "Physical exercise in the elderly people". *Selección* 1996; **5** (3):121-128; Ribas J, *et al.* "Effects of gelatine hydrolysates in the prevention of sportsmen and woman injuries". *Arch Med Deport* 1998; **XV n° 66**: 277-282; y Trentham *et al.* "Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis". *Science* 1993; **261**: 1727-1730.

Los investigadores de la presente invención han desarrollado un procedimiento de obtención de un hidrolizado de colágeno con elevadas ventajas respecto a los procedimientos actuales, a la vez que resulta más económico, y han descubierto una aplicación del hidrolizado obtenido que resulta también altamente beneficiosa para la población.

Cada vez más, la población se preocupa por la dietética y la nutrición, tanto animal como humana. Con ello han aparecido en el mercado múltiples preparados conocidos como suplementos nutricionales, que aportan a los animales o las personas la cantidad necesaria de vitaminas, sales minerales o aminoácidos esenciales. También en el campo de los suplementos nutricionales se ha empleado el colágeno para obtener preparaciones que favorezcan la recuperación de los cartílagos en animales que sufren enfermedades vinculadas a este tipo de tejido.

Como suplemento nutricional debe entenderse todo aquel aporte adicional dietético que se consume por vía oral y que contiene un "ingrediente alimenticio" destinado a complementar la alimentación. Algunos ejemplos de suplementos dietéticos o nutricionales son las vitaminas, los minerales, los productos vegetales (una sola especie o una mezcla de varias), otros productos botánicos, aminoácidos y componentes de los alimentos, como las enzimas. Generalmente, los suplementos nutricionales se distribuyen en forma de diferentes presentaciones, como comprimidos, cápsulas, cápsulas blandas, líquidos y polvos.

También en el campo de la nutrición se están dando a conocer últimamente los denominados alimentos funcionales. Los alimentos funcionales se considera que son aquellos alimentos que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes biológicamente activos, que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Entre algunos ejemplos de alimentos funcionales destacan los alimentos que contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos o fibra alimenticia, los alimentos a los que se han añadido sustancias biológicamente activas, como los fitoquímicos u otros antioxidantes, y los probióticos, que tienen cultivos vivos de microorganismos beneficiosos. Son ejemplos de alimentos funcionales algunos yogures con probióticos, algunas margarinas enriquecidas con ésteres de esteroides y los huevos ricos en ácidos grasos del tipo omega-3.

Tanto los alimentos funcionales como los suplementos nutricionales se asocian científicamente a la mejora de la calidad de vida de las personas o animales que los ingieren. También se han asociado a la sensación de bienestar general que provocan, tomados solos o como complemento a determinados tratamientos terapéuticos.

Aunque resulta un término difícil de definir, por calidad de vida se entiende toda aquella evaluación de la experiencia que de su propia vida tienen los sujetos. Así, la mayoría de autores conciben la calidad de vida como una construcción compleja y multifactorial, sobre la que pueden desarrollarse algunas formas de medida objetiva a través de una serie de indicadores, pero donde tiene un importante peso específico la vivencia que el sujeto pueda tener de sí mismo. Algunos de los indicadores para determinar o valorar la calidad de vida de un sujeto son la función y rol físicos, el dolor corporal, la salud en general, la vitalidad, etc.

Breve descripción de los dibujos

A modo de ejemplo y para ilustrar mejor el objeto de la presente invención, se adjuntan dos figuras, en las que:

5 La Fig. 1 muestra el gráfico de un cromatograma correspondiente a la distribución de los pesos moleculares de un hidrolizado de colágeno según el estado de la técnica; y

La Fig. 2 representa un cromatograma correspondiente a la distribución de los pesos moleculares de un hidrolizado de colágeno según la invención y obtenible por el procedimiento descrito.

10

Explicación de la invención

15 El hidrolizado de colágeno objeto de la presente invención, con una acidez total muy baja y con un perfil de pesos moleculares adecuado, comprendidos entre los 1.000 Daltons y los 50.000 Daltons, en su esencia se caracteriza porque tiene una acidez total, expresada en grados Dornic, inferior a 25°D; y una conductividad en solución al 1% en peso no superior a 500 μ S/cm.

20 Se entiende por grado Dornic el hidróxido sódico a una concentración de 0,111 N consumido en una valoración de 10 g de hidrolizado enzimático de colágeno, donde el punto final lo marca el viraje de la fenolftaleína.

Según otra característica de la invención, la acidez total, expresada en grados Dornic, es inferior o igual a 20°D.

25 El hidrolizado enzimático de colágeno según la invención se caracteriza también porque tiene un peso molecular comprendido entre 5.000 y 20.000 Daltons.

Según otra característica de la invención, el hidrolizado enzimático de colágeno comprende un 99% en peso de hidrolizado sobre producto seco.

30 El hidrolizado enzimático de colágeno según la invención se obtiene por una combinación de reacciones de hidrólisis enzimática y filtración con membranas que permiten la consecución de un producto final con una acidez total muy baja sin modificar el perfil de pesos moleculares del producto.

35 Así, es también objeto de la presente invención, un procedimiento de obtención de un hidrolizado de colágeno de baja acidez total según la invención que, partiendo de tejido dérmico de origen animal, procesado en su forma nativa, o previamente sometido a extracción acuosa, a diferentes temperaturas, una o repetidas veces, y a posterior hidrólisis ácida o básica, se caracteriza porque comprende las etapas de:

40 a) extracción acuosa del tejido dérmico de partida a una temperatura comprendida entre 40°C y 140°C, durante un tiempo comprendido entre 2 y 8 horas;

b) ajuste del pH entre 6,0 y 8,0 mediante soluciones de ácidos o bases minerales;

c) filtración de la solución obtenida en la etapa b);

45 d) desmineralización de la solución filtrada por paso de la misma a través de resinas de intercambio iónico y/o equipos de diálisis por membranas;

e) ultrafiltración de la solución desmineralizada a través de membranas con un diámetro de poro de 1.000 a 50.000 Daltons;

50 f) hidrólisis enzimática de la solución ultrafiltrada, con una cantidad de enzima comprendida entre 1.000 UI y 4.000 UI por kilogramo de producto seco a hidrolizar y a un pH comprendido entre el pH óptimo de la enzima \pm 0,5 unidades de pH;

55 g) filtración de la solución de colágeno hidrolizado enzimáticamente;

h) ultrafiltración a través de membranas con un diámetro de poro de 10.000 a 40.000 Daltons;

60 i) concentración de la solución de hidrolizado enzimático de colágeno mediante calefacción, a temperaturas inferiores o iguales a 70°C, a una presión comprendida entre 10 y 0,0001 mm de Hg, hasta una concentración final de hidrolizado enzimático de colágeno del 15% al 45% en peso;

65 j) secado del hidrolizado enzimático de colágeno hasta obtener un producto seco con una humedad inferior o igual al 8% y una densidad entre 0,3 y 0,8 g/ml.

El procedimiento según la invención se caracteriza también porque en la etapa f) se realiza la hidrólisis enzimática de la solución ultrafiltrada con una cantidad de enzima comprendida entre 1.500 UI y 2.500 UI por kilogramo de producto seco a hidrolizar y a un pH comprendido entre el pH óptimo de la enzima \pm 0,5 unidades de pH.

ES 2 298 071 B1

Según otra característica del procedimiento de obtención de hidrolizado enzimático de colágeno de baja acidez total, la etapa a) de extracción acuosa de la materia prima se realiza a una temperatura comprendida entre 45°C y 100°C, concretamente entre 50°C y 80°C y preferentemente durante un tiempo comprendido entre 4 y 6 horas.

5 El procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno de baja acidez total según la invención, se caracteriza también porque después de la extracción acuosa se ajusta el pH de la solución entre 7,4 y 7,6.

En el caso particular del hidrolizado de colágeno objeto de la presente invención, la etapa de desmineralización mediante sistemas de diálisis se prolonga hasta conseguir una conductividad absoluta inferior a 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

10 El procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno está caracterizado porque la etapa de ultrafiltración e) de la solución de colágeno hidrolizado enzimáticamente se lleva a cabo a través de membranas con un diámetro de poro de 5.000 a 20.000 Daltons.

15 Según otra característica del procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno según la invención, la etapa de concentración i) de la solución de hidrolizado enzimático de colágeno se realiza a una temperatura inferior o igual a 60°C. Dicha etapa de concentración i) se realiza, de un modo preferido, a una presión comprendida entre 1,0 y 0,01 mm de Hg.

20 Otro objeto de la presente invención es un alimento funcional que comprende el hidrolizado enzimático de colágeno anteriormente descrito. Dicho hidrolizado tiene un peso molecular comprendido entre 1.000 y 50.000 Daltons, preferentemente entre 5.000 y 20.000 Daltons, una acidez total expresada en grados Dornic, inferior a 25°D, una conductividad en solución al 1% en peso no superior a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un 99% en peso de hidrolizado de colágeno sobre producto seco.

25 El alimento funcional, según la invención se caracteriza porque comprende leche cruda o tratada térmicamente.

Además, el alimento funcional según la invención también se caracteriza por contener un compuesto seleccionado independientemente de entre: compuestos antioxidantes, sales minerales, vitaminas y/o coenzimas, extractos vegetales, extractos de origen animal y compuestos coadyuvantes del hidrolizado enzimático de colágeno, o una mezcla de todos ellos.

30 Otro objeto de la presente invención es un preparado a base de leche, o un suplemento nutricional, que comprende un hidrolizado enzimático de colágeno, que tiene un peso molecular comprendido entre 1.000 y 50.000 Daltons, preferentemente entre 5.000 y 20.000 Daltons, comprende un 99% en peso de hidrolizado de colágeno sobre producto seco, tiene una acidez total expresada en grados Dornic, inferior a 25°D, y una conductividad en solución al 1% no superior a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

40 El suplemento nutricional según la invención se caracteriza también porque además comprende un compuesto seleccionado independientemente de entre: compuestos antioxidantes, sales minerales, vitaminas y/o coenzimas, extractos vegetales, extractos de origen animal y compuestos coadyuvantes del hidrolizado enzimático de colágeno, o una mezcla de todos ellos.

45 Es también objeto de la presente invención el uso de un hidrolizado enzimático de colágeno que tiene un peso molecular comprendido entre 1.000 y 50.000 Daltons, preferentemente entre 5.000 y 20.000 Daltons, con un 99% en peso de hidrolizado de colágeno sobre producto seco, y con una acidez total expresada en grados Dornic, inferior a 25°D, y una conductividad en solución al 1% en peso no superior a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, para la preparación de un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la capacidad funcional y/o la calidad de vida de un mamífero con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares.

50 La presente invención también tiene por objeto el uso del hidrolizado enzimático de colágeno para la preparación de un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la función física.

55 Por producto lácteo debe entenderse la propia leche en todas sus formas (entera, desnatada, semidesnatada, etc.) y cualquier derivado de la leche tal como quesos, margarinas, natas, etc.

Otro objeto de la presente invención es el uso del hidrolizado enzimático de colágeno para la preparación de un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para atenuar la sensación de dolor corporal.

60 La presente invención también tiene por objeto el uso del hidrolizado enzimático de colágeno para preparar un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la salud general.

Otro objeto de la presente invención es el uso del hidrolizado enzimático de colágeno para preparar un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la vitalidad.

65 La invención también se refiere al uso del hidrolizado enzimático de colágeno para la preparación de un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la función social, el rol emocional y/o la salud mental.

ES 2 298 071 B1

El uso según la invención se caracteriza además porque la dosis diaria de hidrolizado enzimático de colágeno está comprendida entre 0,1 y 0,25 g/Kg de peso corporal.

5 El uso según la invención se caracteriza también porque es para una preparación en forma de solución o suspensión oral.

Según otra característica del uso del hidrolizado enzimático de colágeno según la invención, el mismo es para una preparación en forma de comprimidos o polvos dispersables en agua o leche.

10 El uso del hidrolizado enzimático de colágeno según la invención, se caracteriza porque el mamífero con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares es un humano.

Descripción detallada de la invención

15 A continuación se detallan las características esenciales de un hidrolizado enzimático de colágeno de baja acidez de acuerdo con la invención, en base a un posible procedimiento de obtención del mismo, también objeto de la invención, resaltando las ventajas tanto del hidrolizado como de su procedimiento de obtención.

20 En el citado procedimiento se parte de tejido dérmico de origen animal, obtenido en condiciones higiénicas, de especies animales aptas para el consumo humano (bovino, porcino, aves y pescado). Dichos tejidos pueden ser procesados en su forma nativa, o previamente sometidos a extracción acuosa, a diferentes temperaturas, una o repetidas veces, y a posterior hidrólisis ácida o básica. En este punto, los tejidos contienen cantidades de colágeno que oscilan entre el 2% y 12%, resultando especialmente válidos aquéllos con un contenido residual superior al 5%.

25 En el caso particular de tejidos sometidos a extracción previa, se tratará de subproductos de procesos de obtención de gelatinas. Los procesos de extracción de gelatina clásicos se basan, a grandes rasgos, en la maceración del tejido dérmico en condiciones de extrema acidez o alcalinidad, durante un tiempo total de 4 a 24 horas, seguido de un lavado con agua desmineralizada, una decantación de la grasa liberada y una neutralización con soluciones ácidas o básicas inorgánicas. Posteriormente se procede a la solubilización de la gelatina, mediante extracción del tejido
30 sólido con disolventes acuosos, en nuestro caso particular, el disolvente es agua desmineralizada. En este punto se separa la solución de gelatina del resto sólido. La fracción acuosa se somete a precipitación selectiva de las proteínas no colagénicas, eliminación de éstas por filtración, desmineralización, secado y molturación. La fracción sólida, que en condiciones normales representaría un importante problema, debido a su elevada carga de materia orgánica, se convierte, según esta invención, en materia prima de un proceso de obtención de hidrolizado de colágeno de baja
35 acidez total.

Con la finalidad de obtener un hidrolizado de colágeno con unas características que lo hagan apto para la elaboración de productos lácteos, la materia prima descrita anteriormente es sometida a una pluralidad de etapas hasta obtener un hidrolizado enzimático de colágeno de alta pureza, de peso molecular controlado y con unas características físico-químicas particulares y especiales que lo hacen apto para su uso en la elaboración de productos lácteos, especialmente aquellos que son sometidos a tratamientos térmicos.

45 En la primera de las etapas, la materia prima de partida, tanto el tejido dérmico en forma nativa, como el subproducto de procesos de obtención de gelatina anteriormente descritos, se someten a una extracción acuosa a una temperatura comprendida entre 40°C y 140°C y durante un tiempo comprendido entre 2 y 8 horas. De un modo preferido, la extracción acuosa se realiza entre los 45°C y los 100°C; y más preferiblemente entre los 50°C y 80°C. El tiempo de la extracción también puede variar y de un modo preferente suele tener una duración de 2 a 6 horas.

50 Seguidamente, el pH de la solución extraída se ajusta entre 6,5 y 8,0, empleándose soluciones de ácidos o bases minerales. A tal fin, pueden emplearse por ejemplo soluciones de ácido clorhídrico. De un modo preferido y más preciso el pH se ajusta entre 7,4 y 7,6.

55 Una vez ajustado el pH, la solución es filtrada por ejemplo mediante el empleo de filtros de vidrio poroso, membranas de acetato de polivinilo, fibras de nylon, carbón activado o filtros rotativos de tierras de diatomeas. Evidentemente, pueden emplearse combinaciones de todos estos filtros hasta obtener un producto transparente.

60 Dicha solución filtrada es sometida a una posterior etapa de desmineralización haciéndose pasar a través de resinas de intercambio iónico o equipos de diálisis. Para ello, se emplean, resinas mixtas, por ejemplo, de intercambio aniónico seguidas de intercambio catiónico o viceversa. Con esta etapa se consigue desmineralizar la solución filtrada hasta obtener una nueva solución con una conductividad absoluta inferior a 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y un contenido total inferior al 0,5% de sales minerales, o al menos un contenido en peso de sales minerales inferior al 1,0%, de modo que la riqueza en colágeno sobre extracto seco esté comprendida entre el 99% y el 99,5% en peso.

65 Los parámetros a controlar en esta etapa de desmineralización son la cantidad de solución a desmineralizar, que debe estar comprendida entre los 20 y los 300 litros por kilogramo de resina, siendo preferente el intervalo de 80 a 120 litros de solución por kilogramo de resina. Otro parámetro importante es la velocidad de paso de la solución a desmineralizar, la cual debe estar comprendida entre los 5 litros/minuto/Kg de resina y los 100 litros/minuto/Kg de resina. Preferentemente la velocidad empleada es de 20 a 40 litros/minuto/Kg de resina. En el caso particular del uso

ES 2 298 071 B1

de equipos de diálisis, la solución de colágeno, previamente filtrada, será sometida a sucesivos pasos a través de las membranas de diálisis, en configuración de recirculación con purga, hasta alcanzar un régimen estacionario en el que la conductividad absoluta de la solución no supere los 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

5 Después de la etapa de desmineralización, la solución es ultrafiltrada mediante el paso por membranas con un diámetro de poro de 1.000 a 40.000 Daltons. Con esta etapa se pretenden eliminar todas las fracciones de restos proteicos de bajo peso molecular, así como todas aquellas sales minerales y aminos biógenas que son las causantes de males olores y mal sabor, tal como la putrescina o la cadaverina. De un modo preferente, las membranas utilizadas para la etapa de ultrafiltración tienen un tamaño de poro de 20.000 Daltons.

10 Tras la ultrafiltración, la solución resultante es sometida a hidrólisis enzimática con enzimas proteolíticas bajo unas condiciones de temperatura y pH adecuados para que dichas enzimas puedan actuar.

15 A modo de ejemplo pueden emplearse enzimas como la papaína, la ficina o la bromelaína solas o en combinación.

Son también objeto de la presente invención las especiales condiciones de la hidrólisis enzimática. Para la obtención de un hidrolizado de colágeno de baja acidez y peso molecular entre 1.000 y 50.000 Daltons, preferentemente entre 5.000 y 20.000 Daltons, se emplean dosis controladas de enzimas proteolíticas, a temperatura y tiempo controlados y pH constante. Las cantidades de enzima serán del orden de 1.000 UI a 4.000 UI por kilogramo de producto seco a hidrolizar. Se ha observado que concentraciones de enzima comprendidas entre 1.500 UI y 2.500 UI por kilogramo de producto seco son preferidas para la obtención de hidrolizados de colágeno de baja acidez total.

20 Las temperaturas de trabajo, así como los tiempos de hidrólisis preferidos dependerán de la enzima, o combinación de enzimas, utilizada. A su vez, el pH se controlará durante toda la hidrólisis para evitar una deriva superior a 2 unidades respecto al pH óptimo de actuación de la enzima, o combinación de enzimas, preferentemente se mantendrá un pH, durante toda la hidrólisis, dentro de un rango de $\pm 0,5$ unidades respecto al pH óptimo.

30 El rango de temperaturas a las que se realiza la etapa de hidrólisis enzimática suele estar comprendido entre los 15°C y los 80°C, en función del rango óptimo de trabajo de la o las enzimas. Se obtienen resultados muy satisfactorios en un rango de temperaturas de los 40°C a los 70°C. Las enzimas se dejan actuar sobre la solución ultrafiltrada durante 30 a 200 minutos, preferentemente de 90 a 120 minutos y a un pH de la solución de reacción entre 5 y 9, más concretamente entre 6,8 y 7,8, aunque este valor dependerá de las enzimas utilizadas.

35 Para una correcta evolución de la hidrólisis, se realiza un control continuo del pH y se compensa la deriva natural de este parámetro mediante la adición de soluciones diluidas de álcali, por ejemplo solución de hidróxido sódico.

40 Una vez transcurrido el tiempo fijado para la hidrólisis enzimática deben desactivarse las enzimas, que al tratarse generalmente de enzimas termolábiles es factible mediante el solo hecho de aumentar la temperatura del producto a temperaturas de 90°C entre 5 y 30 minutos.

45 La solución de hidrolizado enzimático de colágeno obtenida es sometida a una nueva etapa de filtración con la finalidad de asegurar la ausencia de cualquier tipo de partículas que pudieran inestabilizar el producto, así como dar una transparencia total al mismo. A modo de ejemplo, el filtro a emplear puede ser de marcos y placas, de filtración en profundidad o bien filtros de vidrio poroso.

50 En cualquier caso, esta etapa de filtración de la solución de hidrolizado enzimático de colágeno va seguida de una etapa de ultrafiltración a través de membranas con un diámetro de poro de 1.000 a 40.000 Daltons. De hecho, el objetivo de esta ultrafiltración es el de eliminar todas aquellas fracciones de péptidos superiores a 20.000 Daltons, así como las fracciones de muy bajo peso molecular (< 1.000 Daltons). En realidad, esta etapa de ultrafiltración consiste en una filtración o exclusión molecular para seleccionar todas aquellas fracciones de hidrolizado enzimático de colágeno, especialmente las de peso molecular comprendido entre los 5.000 Daltons y los 20.000 Daltons.

55 Llegados a este punto, la solución de hidrolizado enzimático de colágeno es concentrada mediante calefacción a temperaturas inferiores o iguales a 70°C con el objetivo de obtener un producto concentrado que pueda ser secado, por ejemplo por atomización.

60 De un modo preferente, la etapa de concentración se lleva a cabo a una temperatura inferior o igual a 60°C y mediante la aplicación de vacío, a fin de evaporar el agua a temperaturas por debajo de la temperatura de ebullición de esta última. Así, se suelen emplear presiones que oscilan entre los 10 y los 0,0001 mm de Hg, preferentemente de 1,0 a 0,01 mm de Hg.

65 Dicha etapa de concentración se da por finalizada cuando se alcanzan concentraciones finales de hidrolizado enzimático de colágeno en solución del 15% al 45% en peso. Concretamente, es preferido un rango de concentraciones del 30% al 45% en peso de hidrolizado enzimático de colágeno en solución.

Finalmente, la solución de hidrolizado enzimático de colágeno con un porcentaje en peso del mismo del 30% al 45% es secada hasta obtener un producto seco con una humedad inferior o igual al 8% y una densidad comprendida entre los 0,3 g/ml y 0,8 g/ml, preferentemente entre 0,4 g/ml y 0,6 g/ml.

ES 2 298 071 B1

Esta etapa final de secado del producto se realiza por liofilización o bien por atomización.

5 El procedimiento según se ha descrito permite obtener de un modo económico un hidrolizado enzimático de colágeno con parámetros constantes de lote a lote y altamente estable. Los estudios de estabilidad realizados han revelado que el citado hidrolizado tiene un periodo de validez de unos 4 años almacenado a una temperatura controlada de 25°C y a una humedad relativa del ambiente inferior al 60%.

10 El hidrolizado enzimático de colágeno obtenible de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito se caracteriza por su gran pureza y por sus características organolépticas idóneas para ser administrado en preparaciones orales. Concretamente, el hidrolizado enzimático de colágeno comprende un 99% en peso de hidrolizado sobre producto seco.

15 Dicho hidrolizado enzimático de colágeno, también objeto de la invención, tiene un peso molecular comprendido entre los 1.000 Daltons y los 50.000 Daltons, siendo el rango preferido de pesos moleculares de 5.000 a 20.000 Daltons.

Los parámetros controlados en el producto final y sus límites se exponen a continuación:

20 Riqueza: Debe ser superior al 99% sobre producto seco.

Humedad: Debe ser inferior al 8%.

Densidad aparente: Debe estar comprendida entre 0,3 y 0,8 g/ml, de preferencia 0,4 y 0,6 g/ml.

25 pH (sol. al 20%): Debe estar entre 6,0 y 7,0.

Acidez (grados Dornic): Inferior a 25°D.

30 Viscosidad (sol. al 20%): Debe estar comprendida entre 15 y 25 mps.

Turbidez (sol. al 20%): Debe ser inferior a 25 NTU.

Conductividad relativa (sol. al 1%): Debe ser inferior a 500 μ S/cm.

35 Cenizas: Deben ser inferiores al 1%.

40 Las características de salinidad, baja acidez y pesos moleculares del hidrolizado enzimático de acuerdo con la invención lo hacen adecuado y óptimo para su aplicación en productos lácteos o que contengan leche, sin que por ello se produzca la degradación de dicho producto lácteo o se vean modificadas sus características físicas y/o organolépticas.

45 A continuación se detallan, a modo de ejemplos no limitativos, variantes del procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno según la invención. También se detallan los parámetros controlados en el hidrolizado enzimático obtenible por el procedimiento.

Ejemplo 1

50 7.500 Kg de tejido dérmico de origen porcino, obtenido directamente, y en condiciones higiénicas, de sala de despiece, y conservado a una temperatura inferior a 5°C, se someten a las siguientes etapas:

1.- Maceración en solución de ácido clorhídrico durante 4 horas.

55 2.- Neutralización a pH superior a 4 e inferior a 6 con hidróxido sódico.

3.- Extracción a 60°C durante 4 horas.

4.- Ajuste de pH a 7,5 empleando hidróxido sódico.

60 5.- Filtración con filtro rotativo de tierra de diatomeas.

6.- Desmineralización mediante membranas de diálisis, en configuración de recirculación y purga, hasta un régimen estacionario en el que la conductividad absoluta no supere los 1.000 μ S/cm.

65 7.- Ultrafiltración a través de una membrana de 20.000 Daltons.

8.- Hidrólisis controlada enzimáticamente añadiendo 1.350.000 U.I. de endopeptidasa de origen bacteriano sobre el producto, a pH 7,2, a 60°C durante 110 minutos.

ES 2 298 071 B1

9.- Desactivación de los enzimas mediante tratamiento térmico a 90°C durante 20 minutos.

10.- Filtración a través de filtro de marcos y placas de 25 μm .

5 11.- Ultrafiltración a través de membrana de 5.000 Daltons.

12.- Concentración a 45°C con un vacío de 0,15 mm de Hg hasta una concentración de sólidos del 40 0/0

10 13.- Secado por atomización (spray drying)

El producto (hidrolizado enzimático de colágeno) obtenido con este proceso (805 Kg) presentó las siguientes características físico químicas:

15 Riqueza (sobre producto seco): 99,5%.

Humedad: 4,5%.

20 Densidad aparente: 0,483 g/ml.

pH (sol. al 20%): 6,08.

Acidez (10 g): 19,8°D. (Según la escala Dornic).

25 Viscosidad (sol. al 20%): 20,9 mps.

Turbidez (sol. al 20%): 24,6 NTU.

30 Conductividad relativa (0,5%): 315 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Cenizas: 0,5%.

Ejemplo 2

35 7.500 Kg de tejido dérmico de origen porcino, obtenido directamente, y en condiciones higiénicas, de sala de despiece, y conservado a una temperatura inferior a 5°C, se someten a las siguientes etapas:

40 1.- Maceración en solución de ácido clorhídrico durante 4 horas.

2.- Neutralización a pH superior a 4 e inferior a 6 con hidróxido sódico.

3.- Extracción a 65°C durante 4 horas.

45 4.- Ajuste de pH a 7,5 empleando hidróxido sódico.

5.- Filtración con filtro rotativo de tierra de diatomeas.

50 6.- Desmineralización mediante membranas de diálisis, en configuración de recirculación y purga, hasta un régimen estacionario en el que la conductividad absoluta no supere los 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

7.- Ultrafiltración a través de una membrana de 20.000 Daltons.

55 8.- Hidrólisis controlada enzimáticamente añadiendo 2.000.000 U.I. de endopeptidasa de origen bacteriano sobre el producto a pH 7,8 a 60°C durante 110 minutos.

9.- Desactivación de los enzimas mediante tratamiento térmico a 90°C durante 20 minutos.

60 10.- Filtración a través de filtro de marcos y placas de 10 μm .

11.- Ultrafiltración a través de membrana de 5.000 Daltons.

12.- Concentración a 40°C con un vacío de 0,1 mm de Hg hasta una concentración de sólidos del 45%.

65 13.- Secado por atomización (spray drying)

ES 2 298 071 B1

El producto obtenido (hidrolizado enzimático de colágeno) con este proceso (950 Kg) presentó las siguientes características físico químicas:

Riqueza (sobre producto seco): 99,6.

Humedad: 4,9 0/0.

Densidad aparente: 0,495 g/ml.

pH (sol. al 20%): 6,12.

Acidez (10 g): 16,9°D. (Según la escala Dornic).

Viscosidad (sol. al 20%): 21,1 mps.

Turbidez (sol. al 20%): 18,5 NTU.

Conductividad relativa (0,5%): 210 μ S/cm.

Cenizas: 0,4 0/0.

Evidentemente, el hidrolizado enzimático de colágeno de acuerdo con la invención, con una acidez total, expresada en grados Dornic, inferior a 25°D; y una conductividad en solución al 1% no superior a 500 μ S/cm, puede obtenerse mediante otros procedimientos, tal como procedimientos biotecnológico, en los cuales puede pensarse en la inmovilización de las enzimas en soportes extraíbles y fácilmente recuperables, o mediante el aporte de las enzimas de interés trabajando “*in situ*” dentro de unidades celulares por ejemplo bacterias.

Ejemplo de las evidencias obtenidas mediante la aplicación del procedimiento de acuerdo con la invención expuesto anteriormente:

En las condiciones anteriormente detalladas se obtiene un hidrolizado de colágeno de baja acidez, siendo así compatible con la fabricación de suplementos nutricionales en los que se comprende como ingrediente principal la leche, o derivados lácteos, y en los que el hidrolizado de colágeno está presente en concentraciones comprendidas entre el 2% y el 15% en peso, sin superar una acidez total de 50° en la escala Dornic. En estas condiciones, las mezclas de hidrolizado de colágeno y leche, o derivados lácteos, en las dosis detalladas anteriormente, son estables a los procesos de pasteurización y esterilización, y a la fermentación posterior, en la producción de suplementos alimenticios basados en leche, o derivados lácteos, enriquecidos con hidrolizado enzimático de colágeno.

A modo de ejemplo se presentan en las Figs. 1 y 2 dos cromatogramas correspondientes a la distribución de pesos moleculares de sendos hidrolizados de colágeno, el primero (Fig. 1) corresponde a un hidrolizado de colágeno preparado según el proceso clásico, el segundo (Fig. 2) corresponde al preparado según las condiciones de proceso detalladas anteriormente. También se citan los valores de acidez correspondientes, expresados en grados de la escala Dornic. Se puede observar que se ha conseguido una acidez compatible con la utilización del hidrolizado de colágeno en la formulación de productos lácteos pasteurizados y fermentados, a la vez que se conserva el perfil original de pesos moleculares. La reducción de la acidez es del 38%, mientras se observa que el perfil de pesos moleculares es equivalente.

Así, en la Fig. 1 aparece representado el cromatograma de un hidrolizado enzimático de colágeno, preparado por el procedimiento según el estado de la técnica, con una acidez total de 36,37°Dornic.

Alternativamente, en la Fig. 2, que corresponde a un hidrolizado de colágeno según la invención y obtenido por el procedimiento de acuerdo con la invención, cuya acidez total es de 22,56°Dornic.

Ejemplos de alimentos funcionales y suplementos nutricionales:

De acuerdo con otro de los objetos de la presente invención, a continuación se detallan ejemplos de alimentos funcionales y suplementos nutricionales que comprenden el hidrolizado enzimático de colágeno de baja acidez según la invención, obtenible de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito.

Estos alimentos funcionales o suplementos nutricionales pueden comprender además un compuesto seleccionado independientemente de entre: compuestos antioxidantes, sales minerales, vitaminas y/o coenzimas, extractos vegetales, extractos de origen animal y compuestos coadyuvantes del hidrolizado enzimático de colágeno. También puede emplearse una mezcla de todos ellos.

ES 2 298 071 B1

Ejemplo 1

Alimento funcional: yogurt

5 Se ha preparado con buenos resultados un yogurt con la siguiente composición:

	Leche	73,9 g
10	Hidrolizado enzimático de colágeno	10,0 g
	Leche en polvo desnatada	12,0 g
	Nata	4,0 g
15	Fermentos lácticos	0,1 g

El sabor del yogurt es agradable, así como su aspecto y textura.

20 Ejemplo 2

Alimento funcional: Postre de chocolate

25 Se ha preparado un postre de chocolate con la siguiente composición:

	Leche desnatada	34,8 g
	Hidrolizado enzimático de colágeno	10,0 g
30	Azúcar	15,0 g
	Lactosa	10,0 g
35	Nata	5,0 g
	Almidón de maíz pregelatinizado	12,0 g
	Cacao desgrasado	10,0 g
40	Carragenato	2,0 g
	Gelatina	1,0 g
45	Emulgente	0,2 g

Tanto la extensibilidad como la viscosidad, la textura y el sabor no se ven alterados, mientras mejoramos la capacidad nutricional del alimento.

50 Ejemplo 3

Alimento funcional: yogurt bebible

55 Se ha preparado un yogurt bebible con la siguiente composición:

	Leche	81,4 g
	Hidrolizado enzimático de colágeno	10,0 g
60	Leche en polvo desnatada	6,0 g
	Nata	2,5 g
65	Fermentos lácticos	0,1 g

Esta preparación admite distintas saborizaciones para obtener una gama de yogures bebibles con propiedades funcionales.

ES 2 298 071 B1

Ejemplo 4

Alimento funcional: Batido de leche y chocolate

5 Se ha preparado un batido de leche y chocolate sin que la adición del hidrolizado enzimático de colágeno modifique las características organolépticas del mismo.

10	Leche desnatada	36,0 g
	Sacarosa	18,0 g
	Proteínas de leche	12,0 g
15	Hidrolizado enzimático de colágeno	6,6 g
	Cacao en polvo	6,0 g
	Almidón de maíz	5,4 g
20	Aceite de soja	5,0 g
	Fibra vegetal	5,0 g
25	Carragenatos	2,0 g
	Fosfato disódico	1,5 g
	Diglicéridos de ácidos grasos	1,0 g
30	Cloruro sódico	0,5 g
	Complejo de minerales	0,5 g
35	Complejo vitamínico (A, D, C, grupo B)	0,5 g

Ejemplo 5

40 *Alimento funcional: Queso fundido*

45	Queso blanco	42,5 g
	Crema de leche	30,0 g
	Proteínas de leche	10,0 g
50	Hidrolizado enzimático de colágeno	10,0 g
	Fosfato cálcico	2,0 g
	Polifosfatos	1,5 g
55	Fosfato disódico	1,5 g
	Citrato sódico	1,0 g
	Cloruro sódico	1,0 g
60	Concentrado de minerales de leche	0,5 g

65 La adición del hidrolizado de colágeno no modifica de manera apreciable el sabor, la extensibilidad ni la cremosidad del producto.

Ejemplo 6

Complemento nutricional: Barritas energéticas

5	Sacarosa	28,0 g
	Manteca de cacao	25,0 g
10	Leche entera en polvo	18,0 g
	Hidrolizado enzimático de Colágeno	8,0 g
	Harina de trigo	4,5 g
15	Pasta de cacao	4,8 g
	Harina de maíz	3,5 g
20	Salvado de trigo	3,0 g
	Dextrina de maíz	2,0 g
	Cloruro sódico	1,0 g
25	Lecitina	0,5 g
	Fructosa	1,0 g
	Complejo vitamínico (C, D, grupo B)	0,5 g
30	Aromas	0,2 g

Modificando algunos de los componentes es factible preparar barras para ayudar al control del peso.

En todos estos ejemplos se observa que para la elaboración de suplementos nutricionales o alimentos funcionales en los que se incluye la leche, o un derivado lácteo, la acidez total del producto, expresada como la cantidad de hidróxido sódico consumido para la neutralización de 10 gramos de hidrolizado de colágeno, según la escala de unidades Dornic, debe ser inferior a 50. Preferiblemente inferior o igual a 40.

Ensayo clínico para determinar la mejora en calidad de vida y capacidades funcionales en humanos

De acuerdo con otro de los objetos de la presente invención, los inventores han determinado un nuevo uso del hidrolizado enzimático de colágeno obtenible por el procedimiento anteriormente descrito. Concretamente, el hidrolizado enzimático de colágeno se emplea para la preparación de un suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la capacidad funcional y/o la calidad de vida de un mamífero, concretamente un humano, con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares.

Así, con el fin de estudiar la posible aplicación del nuevo hidrolizado enzimático de colágeno de elevada pureza y de mejor biodisponibilidad (peso molecular inferior, entre 5.000 y 20.000 Daltons) como alimento funcional o como componente de alimentos funcionales o suplementos nutricionales, se decidió llevar a cabo un estudio en 100 voluntarios, a los que a 50 de ellos se administraría este hidrolizado enzimático de colágeno, en una dosis de 10 g diarios, equivalente a una dosis de entre 0,1 y 0,25 g por Kg de peso corporal de hidrolizado enzimático de colágeno y a los otros 50 una dosis diaria de 1,5 g de sulfato de glucosamina, equivalente a una dosis entre 0,015 y 0,0375 g por Kg de peso corporal. El sulfato de glucosamina es ampliamente utilizado, tanto en Europa como en Estados Unidos, a estas dosis para el tratamiento de alteraciones articulares en general y varios estudios validan que la administración de glucosamina es un medio eficaz para mejorar el dolor y la movilidad de las articulaciones con disfunciones consecutivas a alteraciones de los cartílagos articulares.

Con este ensayo se pretendía valorar el efecto del nuevo hidrolizado enzimático de colágeno en aquellas afecciones donde habitualmente se emplean los conocidos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), concretamente en aquellos trastornos de la capacidad funcional o calidad de vida derivados de alteraciones de los cartílagos articulares.

Por otra parte, el sulfato de glucosamina es también ampliamente utilizado en Europa, y sobre todo en Estados Unidos, como alimento funcional o como integrante de alimentos funcionales y suplementos nutricionales (la mono-

ES 2 298 071 B1

grafía de la USP 24 lo incluye en suplementos nutricionales) a estas mismas dosis (1,5 g diarios) y se asegura que mejoran en general las funciones corporales, principalmente las mecánicas (movilidad, agilidad,...) y que mejoran el estado general y la calidad de vida.

5 El ensayo clínico consistió en un estudio multicéntrico, doble ciego, paralelo y comparativo entre el nuevo hidrolizado enzimático de colágeno y el sulfato de glucosamina. La finalidad era comparar la mejoría en la calidad de vida (según el cuestionario genérico SF-36 (The MOS 36-item short-form health survey (SF-36). I. Conceptual framework and item selection. Med care 1992 Jun; 30 (6): 473-483), así como la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de ambos tratamientos administrados por vía oral durante 90 días consecutivos.

10 El estudio se llevó a cabo en 100 voluntarios (de los que fueron evaluables 93) afectados de alteraciones articulares que inducían dolor, disminución de la movilidad y alteración y pérdida notables de la calidad de vida.

15 Los sujetos fueron distribuidos en dos grupos de 50 individuos, de los que fueron evaluables 47 (hidrolizado enzimático de colágeno) y 46 (sulfato de glucosamina) que, tras una semana de lavado, recibieron o bien 10 g de hidrolizado enzimático de colágeno o bien 1.5 g de sulfato de glucosamina diarios durante 90 días consecutivos, siendo por lo tanto la duración del estudio de 3 meses para cada sujeto.

20 La calidad de vida se midió al inicio y al finalizar ambos tratamientos, de modo específico, mediante el cuestionario genérico SF-36, validado en multitud de estudios y revisiones bibliográficas y habiendo sido utilizado en más de 4000 artículos científicos a lo largo de los últimos 20 años, siendo originario del Health Institute, New England Medical Center, Boston (Massachusetts, USA). En España, dicho cuestionario ha sido validado por Alonso y cols. (11) en el IMIM (Instituto Municipal de Investigaciones Médicas) en Barcelona.

25 El SF-36 representa para todos los autores que han llevado a cabo diversas validaciones del cuestionario, un instrumento adecuado, veraz y eficaz muy útil en la investigación y en la práctica clínicas.

30 Con el término “calidad de vida”, con el SF-36, se pretendía valorar aspectos de las disfunciones articulares consecutivas a alteraciones de los cartílagos articulares que no son estrictamente clínicos, sino también aspectos relacionados con la vida diaria del paciente. También se pretendía valorar en qué modo se veía afectada la vida del paciente por la presencia de estas disfunciones articulares, siempre desde el punto de vista del propio paciente. Esta valoración fue multidimensional y se aceptó generalmente incluir, al menos, ocho apartados o parámetros que actúan de indicadores de la capacidad funcional y/o calidad de vida.

35 Los parámetros evaluados corresponden a las facetas de la vida cotidiana más comúnmente afectadas por las dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares. La división de dichos parámetros nos permite diferenciar con claridad actividades y momentos de la vida de las personas en los que el dolor derivado de una alteración articular afecta, o puede afectar, al correcto desarrollo de actividades y tareas. También se distingue entre la afectación de la calidad de vida individual, la relación con otras personas, o el desempeño de una
40 profesión.

Los parámetros evaluados son, y se definen, como sigue.

45 1. Función física: Se entiende por función física la capacidad para realizar actividades básicas de la vida cotidiana como el cuidado personal, la movilidad básica y la capacidad para realizar esfuerzos pequeños o moderados. Este parámetro nos permite valorar el grado en que la alteración de los cartílagos articulares nos limita a título individual.

50 2. Rol físico: Por su parte, el rol físico se define como el parámetro que nos evalúa la capacidad para desempeñar las actividades propias de nuestro puesto de trabajo. Nos permite identificar si nuestra falta de salud afecta a nuestro rendimiento laboral, o nos limita o impide realizar con normalidad las tareas asociadas a nuestro trabajo. Este parámetro nos permite valorar como la falta de salud afecta a las actividades físicas relacionadas con nuestro entorno y en el desempeño del trabajo.

55 3. Dolor corporal: Este parámetro nos da la medida del dolor percibido y su efecto, tanto en el trabajo y en la relación con nuestro entorno, como en las actividades individuales básicas de la vida cotidiana.

60 4. Salud general: Parámetro que valora, por parte del evaluado, la percepción del estado de salud que se tiene de uno mismo. Así como las perspectivas futuras y la percepción individual de la resistencia a enfermar.

5. Vitalidad: Se define, para la interpretación de este estudio, como el sentimiento de energía y vitalidad que se tiene de uno mismo. Engloba también la percepción individual de la resistencia al cansancio y al desánimo.

65 6. Función social: Parámetro gracias al cual podemos valorar cómo la alteración de los cartílagos de las articulaciones, y los problemas derivados de dichas alteraciones, afectan al desarrollo de una vida social satisfactoria. Este parámetro engloba tanto problemas físicos como emocionales. Nos permite valorar como estos problemas interfieren en la vida social habitual.

ES 2 298 071 B1

7. Rol emocional: Se entiende por rol emocional, y así se define para este estudio, el grado en que los problemas emocionales derivados del dolor y la afectación a la capacidad física afectan al desempeño del trabajo, así como a la realización satisfactoria de otras actividades diarias. La valoración del rol emocional nos da información muy valiosa sobre factores tan importantes como el rendimiento o el esmero en el trabajo.

8. Salud mental: Parámetro que nos permite valorar la salud mental general, considerando la depresión, la ansiedad, el autocontrol y el bienestar general.

A continuación, y a modo de resumen, se describen los ocho apartados o parámetros que actúan de indicadores de la capacidad funcional y/o calidad de vida. (Tabla 1)

TABLA 1

Parámetros y significado estudiados para determinar la calidad de vida de un humano con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares

Apartado (Parámetro a evaluar)	Significado
Función Física	Grado en el que la falta de salud limita las actividades físicas de la vida diaria, como el cuidado personal, caminar, subir escaleras, coger o transportar cargas y realizar trabajos moderados e intensos.
Rol Físico	Grado en el que la falta de salud interfiere en el trabajo y otras actividades diarias, produciendo como consecuencia un rendimiento menor del deseado, o limitando el tipo de actividades que se puede realizar o la dificultad de las mismas.
Dolor corporal	Medida de la intensidad del dolor padecido y su efecto en el trabajo habitual y en las actividades del hogar.
Salud General	Valoración personal del estado de salud, que incluye la situación actual y las perspectivas futuras y la resistencia a enfermar.
Vitalidad	Sentimiento de energía y vitalidad, frente al de cansancio y desánimo.
Función Social	Grado en el que los problemas físicos o emocionales derivados de la falta de salud interfieren en la vida social habitual.
Rol Emocional	Grado en el que los problemas emocionales afectan al trabajo y otras actividades diarias, considerando la reducción del tiempo dedicado, del rendimiento y del esmero en el trabajo.
Salud Mental	Valoración de la salud mental general, considerando la depresión, ansiedad, autocontrol y bienestar general.

ES 2 298 071 B1

Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 2.

TABLA 2

Resultados del cuestionario genérico SF-36 aplicado a 100 voluntarios afectados de alteraciones articulares que inducían pérdida notable de calidad de vida

	Hidrolizado enzimático de colágeno					Sulfato de glucosamina				
	m	SD	me	Rango	n	m	SD	me	Rango	n
Visita inicial (día -7)										
Función física	56.0	20.6	55.0	20.0-100.0	47	58.2	21.5	52.5	20.0-100.0	44
Rol físico	36.4	34.8	25.0	0.0-100.0	46	34.8	37.1	25.0	0.0-100.0	46
Dolor corporal	52.5	14.8	52.0	20.0-100.0	46	53.4	14.5	52.0	22.0-84.0	46
Salud General	53.1	16.1	52.0	20.0-97.0	47	54.7	17.1	52.0	25.0-97.0	45
Vitalidad	52.9	15.5	52.5	25.0-100.0	46	53.7	14.2	52.5	30.0-100.0	46
Función social	72.3	18.0	75.0	25.0-100.0	46	71.5	20.1	75.0	25.0-100.0	43
Rol emocional	82.6	34.2	100.0	0.0-100.0	46	90.6	22.9	100.0	0.0-100.0	46
Salud mental	66.8	15.5	64.0	28.0-100.0	45	68.9	12.5	68.0	44.0-96.0	44
Índice de salud física	36.0	7.7	34.2	23.8-52.8	45	35.8	9.8	34.5	20.4-56.8	39
Índice de salud emocional	50.1	9.1	52.1	25.6-66.9	45	51.8	6.8	52.7	29.4-64.9	39
Visita final (día 90)										
Función física	68.2 ²	21.4	70.0	20.0-100.0	47	65.2 ²	23.6	75.0	15.0-100.0	45
Rol físico	61.2 ²	38.2	75.0	0.0-100.0	47	48.4 ²	42.0	50.0	0.0-100.0	46
Dolor corporal	67.1 ^{1,2}	17.0	74.0	22.0-100.0	47	62.7 ^{1,2}	16.6	64.0	22.0-84.0	46
Salud General	56.8 ²	13.7	57.0	30.0-97.0	47	57.6 ²	16.0	52.0	25.0-97.0	45
Vitalidad	57.0 ²	16.7	55.0	25.0-100.0	47	57.1 ²	15.7	55.0	30.0-100.0	46
Función social	81.6 ²	15.2	87.5	50.0-100.0	47	76.1 ²	19.8	75.0	25.0-100.0	44
Rol emocional	89.4 ²	28.7	100.0	0.0-100.0	47	92.8 ²	25.3	100.0	0.0-100.0	46
Salud mental	70.3 ²	13.4	68.0	36.0-100.0	47	70.6 ²	13.3	68.0	44.0-96.0	45
Índice de salud física	42.0²	8.3	44.9	24.8-53.1	47	40.0²	9.9	41.0	21.8-56.8	41
Índice de salud emocional	50.7	7.7	52.1	25.6-66.5	47	51.1	7.1	52.9	29.6-61.6	41

1.-Diferencias estadísticamente significativas entre colatech y glucosamina (GLM, valores repetidos; p<0.05).

2.-Diferencias estadísticamente significativas entre las visitas inicial y final del mismo tratamiento (GLM, valores repetidos; p<0.05).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de ambos grupos de cada visita (GLM, valores repetidos; p<0.05).

De la Tabla 2 puede extraerse que tanto el hidrolizado enzimático de colágeno como el sulfato de glucosamina, administrados durante 90 días consecutivos a dosis de 10 g y de 1.5 g /día respectivamente, mejoran notablemente la calidad de vida en sus diferentes aspectos.

Pero se puede comprobar que, inesperadamente, los valores de las diferencias absolutas entre la visita inicial y final siempre son más amplias con el hidrolizado enzimático de colágeno que con el sulfato de glucosamina.

ES 2 298 071 B1

En aspectos tan importantes como la salud general, la vitalidad, la función social, la función física, el trabajo físico, la función emocional y la salud mental podemos comprobar que el hidrolizado enzimático de colágeno siempre es más eficaz en inducir la mejoría de los distintos parámetros investigados que el sulfato de glucosamina.

5 Del análisis de los resultados globales obtenidos en este estudio clínico se ponen de manifiesto las ventajas de utilizar el hidrolizado enzimático de colágeno objeto de la invención para la preparación de un alimento funcional o suplemento nutricional, para mejorar la capacidad funcional y/o la calidad de vida de las personas con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares.

10 Con el hidrolizado enzimático de colágeno de alta pureza objeto de la invención dentro de las dosis por Kg de peso corporal empleadas en el estudio clínico (0,1 - 0,25 g/Kg peso corporal/día) pueden pues prepararse, debido a su buen sabor y sus buenas características organolépticas, distintos tipos de complementos o suplementos nutricionales, como soluciones o suspensiones bebibles, mezclas de polvos dispersables en agua, comprimidos, cápsulas. Del mismo modo pueden prepararse alimentos funcionales, tales como zumos, yogures, yogures líquidos, natillas, barritas energéticas,
15 barritas adelgazantes, etc, a la vez que el mismo hidrolizado enzimático de colágeno, por su buen sabor, puede ser en sí mismo el propio alimento funcional.

Como conclusión, queda firmemente demostrado que, además, el procedimiento de obtención de un hidrolizado de colágeno objeto de la invención, que valoriza los subproductos residuales contaminantes procedentes de la obtención de gelatinas, no únicamente permite rentabilizar los costes derivados del tratamiento de estos subproductos nocivos para el medio ambiente, sino que también permite obtener un nuevo hidrolizado enzimático de colágeno de alta pureza y bajo peso molecular que, debido a su buen sabor y características organolépticas, puede emplearse tanto en alimentos funcionales, tales como yogures, zumos, postres, barritas energéticas, etc., como en suplementos nutricionales del tipo complejos multivitamínicos, en forma de comprimidos, soluciones, suspensiones, etc.
25

Además, los inventores han descubierto un nuevo uso para este hidrolizado enzimático de colágeno, que permite que la calidad de vida de las personas o animales afectados de disfunciones derivadas de alteraciones en los cartílagos de las articulaciones, pueda verse notablemente mejorada de una manera equivalente y más agradable a la administración de antiinflamatorios, eliminándose los indeseados efectos secundarios de estos últimos.
30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 298 071 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Hidrolizado enzimático de colágeno, con un peso molecular comprendido entre 1.000 y 50.000 Daltons, **carac-**
terizado porque tiene una acidez total, expresada en grados Dornic, inferior a 25°D; y una conductividad en solución
al 1% en peso no superior a 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

2. Hidrolizado enzimático de colágeno según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la acidez total, expresada
en grados Dornic, es inferior a 25°D, preferiblemente inferior o igual a 20°D.

10 3. Hidrolizado enzimático de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
porque tiene un peso molecular comprendido entre 5.000 y 20.000 Daltons.

15 4. Hidrolizado enzimático de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado**
porque comprende un 99% en peso de hidrolizado sobre producto seco.

20 5. Procedimiento de obtención de un hidrolizado de colágeno de baja acidez total a partir de tejido dérmico de
origen animal, en su forma nativa, o a partir de subproductos de procesos de obtención de gelatina, en los que después
de la extracción en medio acuoso de las gelatinas, los tejidos descritos, ricos en colágeno, son sometidos a sucesivas
etapas de extracción acuosa y posterior hidrólisis ácida, básica o enzimática, obteniéndose finalmente un subproducto
residual, **caracterizado** porque comprende las etapas de:

25 a) extracción acuosa del subproducto residual a una temperatura comprendida entre 40°C y 140°C durante un
tiempo comprendido entre 2 y 8 horas;

b) ajuste del pH entre 6,5 y 8,0 mediante soluciones de ácidos o bases minerales;

c) filtración de la solución obtenida en la etapa b);

30 d) desmineralización de la solución filtrada por paso de la misma a través de resinas de intercambio iónico y/o
equipos de diálisis por membranas hasta un régimen estacionario en el que la conductividad absoluta de la solución
no supere los 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$;

35 e) ultrafiltración de la solución desmineralizada a través de membranas con un diámetro de poro de 1.000 a 40.000
Daltons;

f) hidrólisis enzimática de la solución ultrafiltrada con una cantidad de enzima comprendida entre 1.000 UI y 4.000
UI por kilogramo de producto seco a hidrolizar y a un pH comprendido entre el pH óptimo de la enzima $\pm 0,5$ unidades
de pH;

40 g) filtración de la solución de colágeno hidrolizado enzimáticamente;

h) ultrafiltración a través de membranas con un diámetro de poro de 10.000 a 40.000 Daltons;

45 i) concentración de la solución de hidrolizado enzimático de colágeno mediante calefacción a temperaturas in-
feriores o iguales a 70°C a una presión comprendida entre 10 y 0,0001 mm de Hg hasta una concentración final de
hidrolizado enzimático de colágeno del 15% al 45% en peso;

50 j) secado del hidrolizado enzimático de colágeno hasta obtener un producto seco con una humedad inferior o igual
al 8% y una densidad entre 0,3 y 0,8 g/ml.

6. Procedimiento según la reivindicación 5, **caracterizado** porque en la etapa f) se realiza la hidrólisis enzimática
de la solución ultrafiltrada con una cantidad de enzima comprendida entre 1.500 UI y 2.500 UI por kilogramo de
producto seco a hidrolizar y a un pH comprendido entre el pH óptimo de la enzima $\pm 0,5$ unidades de pH.

55 7. Procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6
anteriores, **caracterizado** porque la etapa a) de extracción acuosa del subproducto residual se realiza a una temperatura
comprendida entre 45°C y 100°C, concretamente entre 50°C y 80°C durante un tiempo comprendido entre 4 y 6
horas.

60 8. Procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7
anteriores, **caracterizado** porque después de la extracción acuosa se ajusta el pH de la solución entre 7,4 y 7,6.

65 9. Procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8
anteriores, **caracterizado** porque la etapa de ultrafiltración de la solución de colágeno hidrolizado enzimáticamente,
se lleva a cabo a través de membranas con un diámetro de poro de 5.000 a 20.000 Daltons.

ES 2 298 071 B1

10. Procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 anteriores, **caracterizado** porque la etapa de concentración i) de la solución de hidrolizado enzimático de colágeno se realiza a una temperatura inferior o igual a 60°C.

5 11. Procedimiento de obtención de hidrolizado de colágeno una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10 anteriores, **caracterizado** porque la etapa de concentración i) de la solución de hidrolizado enzimático de colágeno se realiza a una presión comprendida entre 1,0 y 0,01 mm de Hg.

10 12. Alimento funcional que comprende el hidrolizado enzimático de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores.

13. Alimento funcional según la reivindicación 12, **caracterizado** porque comprende leche cruda o tratada térmicamente.

15 14. Alimento funcional según las reivindicaciones 12 ó 13 que además comprende un compuesto seleccionado independientemente de entre: compuestos antioxidantes, sales minerales, vitamina y/o coenzimas, extractos vegetales, extractos de origen animal y compuestos coadyuvantes del hidrolizado enzimático de colágeno, o una mezcla de todos ellos.

20 15. Suplemento nutricional a base de leche que comprende el hidrolizado enzimático de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 anteriores.

25 16. Suplemento nutricional según la reivindicación 15 que además comprende un compuesto seleccionado independientemente de entre: compuestos antioxidantes, sales minerales, vitamina y/o coenzimas, extractos vegetales, extractos de origen animal y compuestos coadyuvantes del hidrolizado enzimático de colágeno, o una mezcla de todos ellos.

30 17. Uso del hidrolizado enzimático de colágeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la capacidad funcional y/o la calidad de vida de un mamífero con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares.

18. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la función física.

35 19. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, suplemento nutricional o alimento funcional para la mejora del rol físico.

40 20. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, un suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la sensación de dolor corporal.

21. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, un suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la salud general.

45 22. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, un suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la vitalidad.

23. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, un suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la función social.

50 24. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, un suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar el rol emocional.

55 25. Uso según la reivindicación 17 para la preparación de un producto lácteo, un suplemento nutricional o alimento funcional para mejorar la salud mental.

26. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 anteriores, donde la dosis diaria de hidrolizado enzimático de colágeno está comprendida entre 0,1 y 0,25 g/Kg de peso corporal.

60 27. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 anteriores, **caracterizado** porque es para una preparación en forma de soluciones o suspensiones orales.

28. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25 anteriores, **caracterizado** porque es para una preparación en forma de comprimidos, cápsulas o polvos dispersables en agua.

65 29. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28 anteriores, en donde el mamífero con dificultades funcionales derivadas de alteraciones de los cartílagos articulares es un humano.

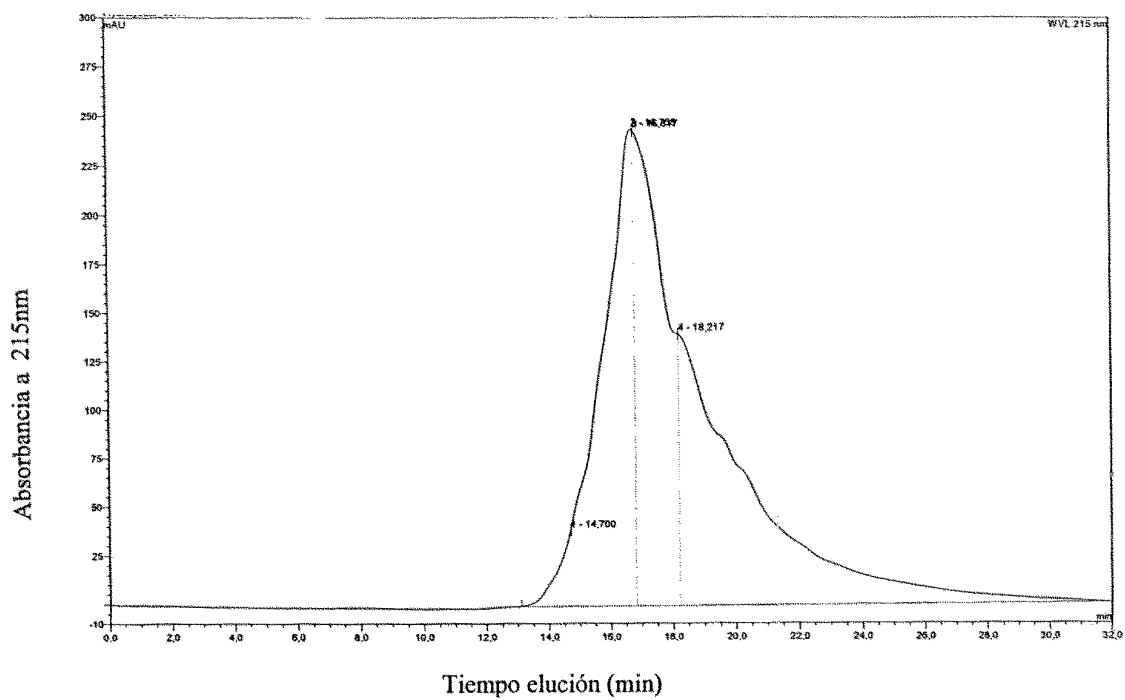


FIG. 1

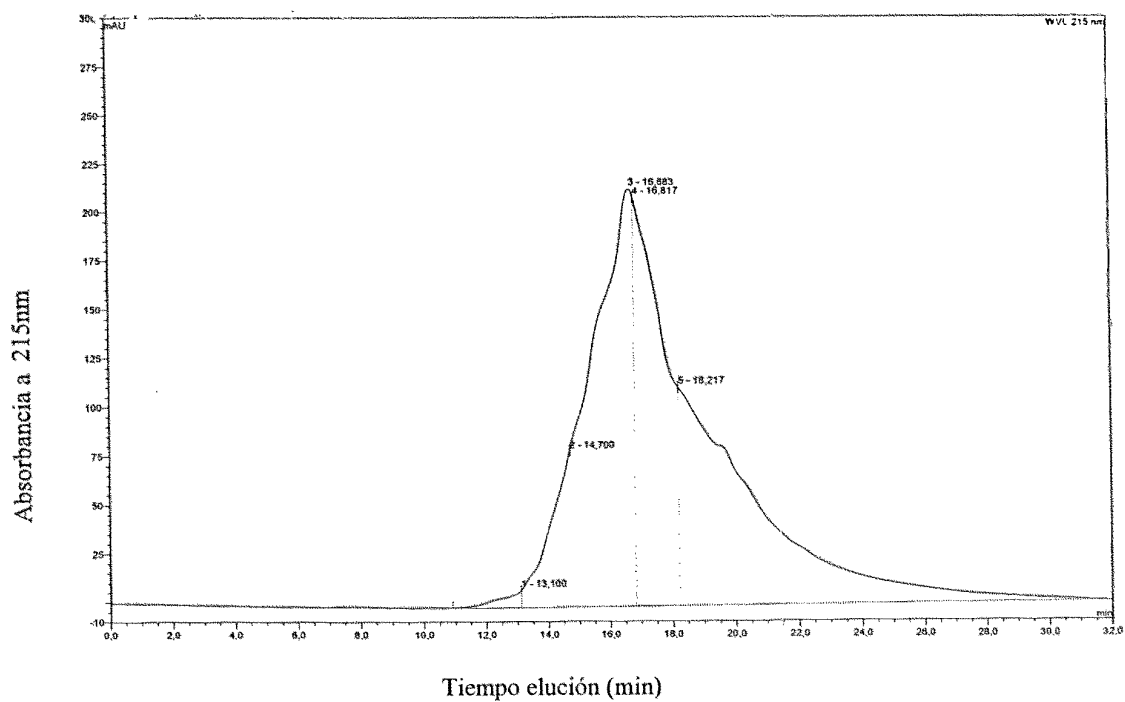


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 298 071

② N° de solicitud: 200602713

③ Fecha de presentación de la solicitud: **25.10.2006**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20030175398 A1 (OGASAWARA et al.) 18.09.2003, reivindicaciones 1-3.	1-3,12-16
X	WO 2005021027 A1 (DEUTSCHE GELATINE-FABRIKEN STOESS AG) 10.03.2005, reivindicaciones 1-3,5-14.	1,3,12-19, 21-22,29
A	CA 2212649 A (BIOCELL TECHNOLOGY) 08.02.1999, reivindicaciones 1-9,11-12,14-16.	1,3,5,7, 10,12,17, 26,29
A	ES 2233947 T3 (DEUTSCHE GELATINE-FABRIKEN STOESS AG) 16.06.2005, reivindicaciones 1-4.	1,3,12,14, 17,26-29
A	WO 2006010606 A1 (BIOGHURT BIOGRADE GMBH & CO KG) 02.02.2006, reivindicaciones 1-7,9-13.	1,3,12,14, 17,26-29

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

20.02.2008

Examinador

I. Galíndez Labrador

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A23L 1/305 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 1/12 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)