

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 114 055**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>: A23J 3/34

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud europea: **93912667.8**

⑧⑥ Fecha de presentación : **26.05.93**

⑧⑦ Número de publicación de la solicitud: **0 642 307**

⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **15.03.95**

⑤④ Título: **Hidrolizado de proteína de suero de leche y método para su producción.**

③⑩ Prioridad: **27.05.92 DK 712/92**

④⑤ Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**16.05.98**

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**16.05.98**

⑦③ Titular/es: **Novo Nordisk A/S**  
**Novo Alle**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

⑦② Inventor/es: **Nielsen, Per Munk y**  
**Hvass, Peter**

⑦④ Agente: **Tomás Gil, Tesifonte-Enrique**

**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 (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCION

Método para la producción de un hidrolizado de proteína de suero de leche y un hidrolizado de proteína de suero de leche.

La invención comprende un método para la producción de un hidrolizado de proteína de suero de leche y el hidrolizado de proteína de suero de leche producido de esta manera.

Muchos métodos para la producción de un hidrolizado de proteína con buenas propiedades organolépticas sólo pueden efectuarse con un rendimiento bajo. Además, una desventaja respecto a los hidrolizados de proteína de suero de leche de la técnica anterior consiste en el hecho de que su alergenicidad es propensa a un aumento. Por ello, es objetivo de la invención indicar un método para la producción de un hidrolizado de proteína de suero de leche con una alergenicidad reducida y con buenas propiedades organolépticas que pueda ser realizado con un rendimiento relativamente alto.

Sorprendentemente, según la invención se ha descubierto que una selección de un material de partida específico, en combinación con una hidrólisis sin condición de pH, provee un proceso para la producción de un producto de baja alergenicidad y aceptable desde el punto de vista organoléptico con alto rendimiento.

Por consiguiente, el método según la invención para la producción de un hidrolizado de proteína de suero de leche está caracterizado por el hecho de

- 1) que la proteína de suero de leche obtenida a través de la producción de caseína precipitada en ácido se mezcla con agua en una mezcla con un contenido de proteína de hasta un 20
- 2) que se realiza un tratamiento de calor a una temperatura por encima de 60 °C,
- 3) que la mezcla de fase 2) es hidrolizada proteolíticamente mediante, por lo menos, una proteasa y a través de un método sin condición pH a un DH de entre un 15 y 35%, y
- 4) que la hidrólisis se finaliza a través de la inactivación de la(s) enzima(s) y además, que la mezcla de fase 3) ó 4) se separa sobre una unidad de ultrafiltración/microfiltración con un valor crítico por encima de 10,000, preferiblemente por encima de 50,000, el permeado constituye el hidrolizado de proteína.

Un hidrolizado de proteína de suero de leche con una composición, similar al hidrolizado de proteína de suero de leche producido mediante el método según la invención se encuentra descrito en US 4,427,658.

También, la EP 226221 describe un hidrolizado de proteína de suero de leche que sin embargo, en contraposición al hidrolizado de proteína de suero de leche producido mediante el método según la invención, no tiene lactosa y es producido mediante técnicas con condición pH.

También US 4,293,571, EP 321603 y EP 322589 describen un hidrolizado de proteína de suero de leche que se produce a través de hidrólisis con tratamiento térmico subsiguiente, en contraposición al hidrolizado de proteína de suero de leche producido mediante el método según la invención, p. ej. mediante tratamiento térmico con hidrólisis subsiguiente. Los altos valores del grado de hidrólisis que pueden obtenerse según la invención no pueden obtenerse con los métodos de la técnica anterior.

EP 65663 describe un hidrolizado de proteína de suero de leche producido sin tratamiento térmico antes de la hidrólisis, en contraposición al método según la invención.

En Research Disclosure, agosto de 1981 n° 20826, se describe un método similar al método según la invención. No obstante, el método de la técnica anterior se limita a la sangre como material de partida, y el método de la técnica anterior se realiza además mediante el método con condición pH.

Por lo que bien sabe el solicitante, todos los métodos de la técnica anterior para la producción de un hidrolizado de proteína de suero de leche provocan un hidrolizado de proteína de suero de leche con un gusto inaceptable y una alergenicidad relativamente alta. El hidrolizado de proteína de suero de leche según la invención tiene un gusto notablemente agradable y una alergenicidad extraordinariamente baja. Además, en relación con muchos métodos de la técnica precedente para la producción de hidrolizado de proteína de suero de leche, el producto final es obtenido con un rendimiento bajo y/o altos costes de producción.

Una forma preferida de realización del método según la invención consiste en el hecho de que la mezcla en fase 1) tenga una proteína de un 7 a 12%. De esta manera el equipamiento se utiliza de manera óptima y además la viscosidad no es demasiada alta para su manipulación.

Una forma preferida de realización del método según la invención consiste en el hecho de que el ajuste de pH en fase 3) se realice mediante  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y/o KOH. De esta manera se obtiene un mejor sabor y además se obtiene una distribución del mineral favorable en el producto final. También puede usarse carbonato de sodio o fosfato de sodio para el ajuste de pH con el objetivo de precipitar el  $\text{Ca}^{++}$  en el producto de proteína de suero de leche crudo.

Una forma preferida de realización del método según la invención consiste en el hecho de que la hidrólisis en fase 3) se realice a un DH de entre un 20 y 35%. De esta manera se obtiene un producto con excelentes propiedades organolépticas.

Una forma de realización preferida del método según la invención consiste en el hecho de que una proteasa producible mediante *B. licheniformis*, preferiblemente Alcalase<sup>®</sup>, y/o una proteasa producible mediante *B. subtilis*, preferiblemente Neutrase<sup>®</sup>, y/o tripsina se use como enzima(s) proteolítica(s). En primer lugar se prefiere especialmente el uso de Alcalase<sup>®</sup> (con un alto óptimo de pH), y entonces Neutrase<sup>®</sup> (con un óptimo de pH inferior). Este método es espe-

cialmente idóneo para el método sin condición pH usado según la invención.

Una forma de realización preferida del método según la invención consiste en el hecho de que la inactivación de la(s) enzima(s) (fase 4) se realice por tratamiento térmico. Esta inactivación es especialmente idónea en el caso que se suponga que el pH del hidrolizado de proteína final es relativamente alto (cercano a la neutralidad).

Una forma de realización preferida del método según la invención consiste en el hecho de que la inactivación de la(s) enzima(s) (fase 4) se realice por tratamiento con ácido. Esta inactivación es especialmente idónea si se supone que el pH del hidrolizado de proteína final es relativamente bajo o (ácido).

Una forma de realización preferida del método según la invención consiste en el hecho de que la mezcla al final de fase 3) o fase 4) sea tratada con carbono activo durante más de 5 minutos a una temperatura que se encuentre preferiblemente entre 50 y 70°C, en una cantidad que corresponda a un 1 y 5% de carbono, calculado en relación al contenido de la sustancia en seco, y que se extraiga el carbono activo. De esta manera se mejora el sabor.

Una forma de realización preferida del método según la invención consiste en el hecho de que después de la fase 4), se produzca una concentración por nanofiltración/hiperfiltración/ósmosis inversa a una temperatura preferiblemente entre 50 y 70°C y/o evaporación, después de lo cual se recoge el producto retenido como la solución de hidrolizado de proteína. A través de nanofiltración se puede realizar una desalinización eligiendo apropiadamente la membrana; además las nanofiltración/hiperfiltración/ósmosis inversa es una manera no costosa para la extracción del agua. La evaporación tiene la ventaja de obtener un alto contenido de sustancia en seco en el concentrado antes del secado.

Una forma de realización preferida del método según la invención consiste en el hecho de que la solución de hidrolizado de proteína de la fase 4) se seque por pulverización hasta un contenido de agua por debajo de un 6,5%. De esta manera se obtiene un producto estable, tanto microbica como organolépticamente.

Además, la invención comprende un hidrolizado de proteína de suero de leche producible mediante el método según la invención y caracterizado por el hecho de que expone la siguiente distribución del peso molecular

	Peso en %
Peso molecular > 5000	< 0,5
1500 < peso molecular < 5000	5 - 15
500 < peso molecular < 1500	40 - 60
Peso molecular < 500	40 - 60

por lo cual el contenido de aminoácidos libres es <15. Sorprendentemente, se ha descubierto que en esta forma de realización se obtiene un hidrolizado de proteína de suero de leche con una antigenicidad extraordinariamente baja. Se hace referencia al ejemplo 1. Esta antigenicidad extraordinariamente baja corresponde a una reducción substancial de la alergenidad.

Además, la invención comprende un hidrolizado de proteína de suero de leche que está caracterizado por el hecho de que es producible a base de un material de partida que es suero de leche de caseína precipitada de manera ácida, exponiendo las siguientes distribuciones de peso molecular

	Peso en %
Peso molecular > 5000	< 0,5
1500 < peso molecular < 5000	5 - 15
500 < peso molecular < 1500	40 - 60
Peso molecular < 500	40 - 60

por lo cual el contenido de aminoácidos libres es <15 y expone una reducción de antigenicidad comparada a Lacprodan 80 de por lo menos 10<sup>5</sup> veces.

La distribución del peso molecular de péptidos en hidrolizados de proteína, como se ha indicado anteriormente, se determina como sigue.

#### 1. Principio

La muestra es diluida, filtrada e inyectada en un sistema cromatográfico de líquidos que opera según la manera de la Cromatografía de Permeación del Gel (CPG). Esta técnica de separación utiliza un flujo líquido a través de una columna llenada con partículas porosas con poros de un diámetro bien definido. Cuando una solución de péptidos con distintas dimensiones moleculares pasa por la columna, los péptidos pequeños podrán fluir por los poros mientras que los péptidos mayores serán excluidos de los poros. Así, los péptidos en una solución estarán separados según su dimensión molecular (y su peso molecular), y los péptidos mayores se eluirán más rápido de la columna que los péptidos menores. Un detector en la salida de la columna mide continuamente el efluio. El sistema cromatográfico es calibrado mediante péptidos con un peso molecular conocido.

#### 2. Equipamiento cromatográfico

##### 2.1 El sistema HPLC consiste en

Bomba a alta presión, Waters M 510, índice de flujo 0,7 ml/min

Inyector, Waters WISP M 710

Detector, Waters M 440, con una extensión de longitud de onda de hasta 214 nm.

##### 2.2 Columna GPC, 3 x TSK G 2000 SWXL, 7.8 mm x 300 mm, acoplada en serie y accionada a temperatura ambiente.

##### 2.3 Integración/elaboración de datos, sistema de datos de cromatografía de Waters 820 MAXIMA SIM con opción 810/820 GPC.

#### 3. Reactivos

##### 3.1 Tampón de fosfato, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

##### 3.2 Amonio cloruro, NH<sub>4</sub>Cl

##### 3.3 Acido trifluoroacético (ATF), CF<sub>3</sub>COOH

##### 3.4 Acetonitrilo, CH<sub>3</sub>CN

### 3.5 Fase Móvil:

0,05 mol de tampón de fosfato/0,5 mol de solución de amonio cloruro que contiene un 0.1% de ATF y un 25% de acetonitrilo

## 4. Descripción

### 4.1 Calibración

El sistema cromatográfico es calibrado mediante inyecciones de numerosos estándares de péptidos con un peso molecular conocido. Se determina el peso molecular de cada estándar de manera semilogarítmica contra el volumen observado de la fase móvil que se necesita para eluir el péptido de la columna. Por un cálculo de cuadrados mínimos, se calcula el polinomio de Y orden mejor ajustado. Esta curva representa la curva de calibración.

### 4.2 Análisis

El ejemplo es diluido y disuelto en la fase móvil hasta unos 5 mg/ml. La solución es filtrada a través de un filtro de 22  $\mu\text{m}$  usando 20  $\mu\text{l}$  para la inyección en el cromatógrafo. Se registra la respuesta del detector al volumen de elución. La curva registrada -el cromatograma- indica la actual distribución del peso molecular de la muestra. Para considerar los cálculos, como distribución de peso acumulado y cálculos promedios de peso molecular, el cromatograma se divide en pequeños segmentos de tiempo (y volumen de elución) -cada segmento se caracteriza por el volumen de elución y el área del cromatograma sobre el intervalo de tiempo.

## 5. Cálculo

Se indican los resultados en términos de peso y número promedio de peso molecular.

$$M_w = \frac{\sum_i (A_i \cdot M_{w,i})}{\sum_i A_i}, \quad M_n = \frac{\sum_i A_i}{\sum_i (A_i / M_{w,i})}, \quad \text{donde}$$

$M_w$  : Peso promedio de peso molecular

$M_n$  : Número promedio de peso molecular

$A_i$  : Área de cromatograma para cada segmento, medido como la respuesta del detector acumulada sobre cada intervalo de tiempo.

$M_{w,i}$  : el peso molecular correspondiente para cada segmento. El valor se calcula mediante la curva de calibración, usando el volumen de elución medio sobre el intervalo de tiempo.

El método y la proteína de suero de leche según la invención serán ilustrados en el siguiente ejemplo.

### Ejemplo 1

#### Alimentación

El material de partida es un concentrado de proteína de suero de leche secado por pulverización (el producto comercial Lacprodan 75CV, obtenido de Danmark Protein A/S, Dinamarca) que contiene unos 80% de proteína calculada como sustancia seca. Este material de partida se obtiene produciendo caseína precipitada en ácido por ultrafiltración/diafiltración, neutralización y secado.

#### Mezcla

El material de partida es diluido con agua desionizada hasta un contenido de proteína de un 8%.

#### Tratamiento térmico

Se realiza la pasteurización calentando a 85°C, manteniendo durante 5 minutos y enfriando a 53°C.

#### Ajuste de pH

El pH se ajusta a 8,0 a través de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

#### Hidrólisis

Temperatura 53°C.

Enzimas: Alcalase® 2,4 L. Dosificación un 2,2%

Neutrase® 0,5L. Dosificación un 1,1%

Hidrólisis durante 18 horas. El aumento en osmolalidad fue 200 mOsm/kg.

#### Fase de ultrafiltración

La mezcla es filtrada mediante un Sistema Millipore Pellicon con membranas PTTK 30,000 NMWL. Temperatura 50°C.

#### Inactivación

Para inactivar las enzimas se calienta el permeado de la fase de ultrafiltración a 85°C durante 3 minutos.

#### Secado

El producto es liofilizado.

La distribución de peso molecular del producto liofilizado se indica en la siguiente tabla.

	Peso en %
Peso molecular > 5000	< 0,1
1500 < peso molecular < 5000	6,6
500 < peso molecular < 1500	47,7
Peso molecular < 500	45,6

por lo cual el contenido de aminoácidos libres es <15

Además, se hace referencia a la figura 1 que indica la distribución del peso molecular del producto liofilizado.

Se realizaron pruebas de antigenicidad, como se indica en lo siguiente.

#### Evaluación de la antigenicidad de hidrolizados de proteína de suero de leche a través de la prueba ELISA

##### 1. Principio

La antigenicidad de un hidrolizado de proteína de suero de leche se analiza a través de un sandwich de doble anticuerpo modificado ELISA. En esta técnica, un anticuerpo (anticuerpo de captura; de conejo) es revestido en un receptáculo de microtitulación. Después se añade la muestra que contiene el antígeno. A continuación un anticuerpo (anticuerpo de detección; de conejillo de Indias) se añade para formar el sandwich anticuerpo-antígeno-anticuerpo. La cuantificación se realiza a través de la reacción con un anticuerpo, marcado por peroxidasa, al conejillo de

Indias (del conejo) y adición de OPD (O-fenilendiamina hidrocloreuro). El color amarillo que se desarrolla es medido en un Lector ELISA.

## 2. Descripción

Se evaluaron las siguientes muestras:

- Lacprodan 80 -proteína de suero de leche bovina (polvo secado por pulverización; 77% de proteína)
- Producto de Ejemplo 1 -hidrolizado de proteína de suero de leche (polvo liofilizado; 78.1% de proteína)

Cada receptáculo de una placa de microtitulación es revestido con un anticuerpo de captura (antisuero del conejo contra proteína de suero de leche bovina; DAKO Z183) y lavado. Las muestras son disueltas en solución tampón a una concentración inicial de 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de Lacprodan 80 y 100  $\text{mg}/\text{ml}$  del producto del Ejemplo 1. diluciones dobles de las muestras son añadidas por duplicado a receptáculos separados e incubadas durante la noche a 4°C. Después se realiza un lavado. A cada receptáculo se le añade un anticuerpo de detección (antisuero del conejillo de Indias a la proteína de suero de leche bovina; preparado mediante Lacprodan 80 como fuente de proteína) y se lava. A cada receptáculo se le añade antisuero de conejo conjugado por peroxidasa al suero de conejillo de Indias (DAKO P141) y se lava. Los receptáculos se elaboran añadiendo OPI (O-fenilendiamina hidrocloreuro) y el color amarillo se mide a través de la lectura de la absorbancia a 492 nm.

## 3. Resultado

El resultado, que muestra la absorbancia medida a 492 nm para distintas concentraciones de proteína en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , se indica en la figura 2. Según las curvas parece que el producto del Ejemplo 1 tenga una antigenicidad notablemente reducida. Comparando las concentraciones de proteína para dar una absorbancia similar, la reducción y antigenicidad puede calcularse: Se reduce la antigenicidad del producto del Ejemplo 1 unas  $1.7 \times 10^5$  veces comparado con la del Lacprodan 80.

*Evaluación de la antigenicidad de hidrolizados de proteína de suero de leche a través del análisis de la reactividad con IgE de leche*

En esta prueba la reducción en antigenicidad se mide de manera relativa al polvo de leche desnatada.

### Sueros de prueba

Se emplearon dos muestras de suero de niños alérgicos a la leche de vaca: KG y LV.

Ambos donantes eran altamente alérgicos a la leche de vaca tal como se comprobó por DBPCFC. Los sueros de los donantes se habían evaluado previamente en cuanto al IgE específico a la leche de vaca y resultaron positivos.

Como suero de control negativo se usó un "pozo de 1000-donantes", preparado de sueros sin reactividad IgE a los alérgenos de inhalación comunes (Poulsen & Weeke, 1985).

### Alérgenos

- Hidrolizado de proteína de suero de leche producido según este ejemplo.

- Sustituyente de leche materna comercial, Nutramigen, 13,0% de proteína
- Polvo de leche desnatada, 37% de proteína

### Experimentos de inhibición

Mediante RAST Maxisorp (Poulsen et al., 1989) se realizaron curvas dosis-respuesta para varias concentraciones de leche desnatada. Se usó una concentración de 1  $\text{mg}/\text{ml}$ . Los experimentos de dilución del suero mostraron que los dos sueros podrían ser diluidos a 1:10 para los experimentos de inhibición, dando una concentración final de 1:20.

Todos los antígenos se condujeron en series de dilución dando concentraciones finales de 50  $\text{mg}/\text{ml}$ , 5  $\text{mg}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{l}/\text{ml}$ , 5  $\mu\text{l}/\text{ml}$  y 500  $\text{ng}/\text{ml}$ . La inhibición se expresa como

% de inhibición=

$$=100 * \frac{\text{respuesta}_{\text{desinhibición}} - \text{respuesta}_{\text{inhibición}}}{\text{respuesta}_{\text{desinhibición}} - \text{respuesta}_{\text{control}}}$$

Las actividades inhibitorias de los productos hidrolizados fueron comparadas y expresadas en relación a la leche desnatada para calcular la distancia horizontal entre las curvas de inhibición para el mismo suero. Como las curvas de inhibición no siempre fueron paralelas, esta distancia fue calculada lo más cerca posible de un 50% de inhibición.

### Resultados

TABLA 1

*Reactividad IgE a los productos de prueba. Los resultados se indican en relación al polvo de leche desnatada.*

Antígeno	% de proteína	Suero KG	Suero LV
Polvo de leche desnatada	37,0	1	1
Nutramigen	13,0	$<<2,8 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
Producto de ejemplo 1	78,1	$<<4,7 \cdot 10^{-6}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$

Esta prueba muestra también una antigenicidad muy baja del producto de prueba. Se ha descubierto que la reactividad IgE del producto de prueba es incluso inferior que la reactividad IgE de un producto hipoalérgico comercialmente bien establecido (Nutramigen). Además, si se considera la diferencia de proteína entre Nutramigen y el producto de prueba, la reducción de antigenicidad del producto de prueba puede ser considerada, por lo menos 60 veces mejor que el Nutramigen.

### Referencias

- Poulsen, L.K. & Weeke, B. Aluminum Hydroxide adsorbed Allergens used in modified RAST (Al-RAST) Allergy, 40: 405 - 416 (1985)
- Poulsen, L.K.; Pedersen, M.F.; Malling, H.-J.; Soendergaard, I. & Weeke, B. Maxisorp RAST. A sensitive method for detection of absolute quantities of anti-specific human IgE Allergy, 44: 173 - 189 (1989)

## REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un hidrolizado de proteína de suero de leche, **caracterizado** por el hecho de

- 1) que la proteína de suero de leche obtenida a través de la producción de caseína precipitada en ácido es mezclada con agua hasta una mezcla con un contenido de proteína de hasta un 20%, preferiblemente hasta un 12%,
- 2) que se realiza un tratamiento térmico a una temperatura por encima de 60°C,
- 3) que la mezcla de fase 2) es hidrolizada proteolíticamente mediante, por lo menos, una proteasa a través de un método sin condición pH a un DH de entre un 15 y 35%, y
- 4) que la hidrólisis es finalizada a través de la inactivación de la(s) enzima(s) y además, que la mezcla de fase 3) ó 4) es separada sobre una unidad de ultrafiltración/microfiltración con un valor crítico por encima de 10,000, preferiblemente por encima de 50,000, el permeado constituye el hidrolizado de la proteína.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la mezcla en fase 1) tiene una proteína de un 7 a 12%.

3. Método según las reivindicaciones 1 a 2, **caracterizado** por el hecho de que un ajuste del pH en fase 3) se realiza mediante  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  y/o KOH.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** por el hecho de que la hidrólisis en fase 3) se realiza a un DH de entre un 20 a 35%.

5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** por el hecho de que se emplea como enzima(s) proteolítica(s) una proteasa producible mediante *B. licheniformis*, preferiblemente Alcalase<sup>®</sup>, y/o una proteasa producible mediante *B. subtilis*, preferiblemente Neutrase<sup>®</sup>, y/o tripsina.

6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por el hecho de que la inactivación de la(s) enzima(s) (fase 4) se realiza a través de tratamiento térmico.

7. Método según las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por el hecho de que la inactivación de la(s) enzima(s) (fase 4) se realiza a través de

tratamiento ácido.

8. Método según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** por el hecho de que la mezcla al final de fase 3) o fase 4) se trata con carbono activo durante más de 5 minutos a una temperatura preferiblemente entre 50 y 70 °C, en una cantidad que corresponde a un 1 hasta 5% de carbono, calculado en relación al contenido de la sustancia en seco y que el carbono activo es extraído.

9. Método según las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** por el hecho de que después de fase 4) se realiza una concentración a través de nanofiltración/hyperfiltración/ósmosis inversa a una temperatura preferiblemente entre 50 y 70 °C y/o evaporación, después de lo cual se recoge el producto retenido como la solución de hidrolizado de proteína.

10. Método según las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** por el hecho de que la solución de hidrolizado de proteína de fase 4) se seca por pulverización hasta un contenido de agua por debajo de un 6.5%.

11. Hidrolizado de proteína de suero de leche, **caracterizado** por el hecho de que es producible según las reivindicaciones 1 a 10, y de que expone las siguientes distribuciones de peso molecular.

	Peso en %
Peso molecular > 5000	< 0,5
1500 < peso molecular < 5000	5 - 15
500 < peso molecular < 1500	40 - 60
Peso molecular < 500	40 - 60

por lo cual el contenido de aminoácidos libres es < 15.

12. Hidrolizado de proteína de suero de leche, **caracterizado** por el hecho de que es producible a través de la base de un material de partida que es suero de leche de caseína precipitada en ácido y **caracterizado** por el hecho de que expone las siguientes distribuciones de peso molecular:

	Peso en %
Peso molecular > 5000	< 0,5
1500 < peso molecular < 5000	5 - 15
500 < peso molecular < 1500	40 - 60
Peso molecular < 500	40 - 60

por lo cual el contenido de aminoácidos libres es < 15, y por el hecho de que expone una reducción de antigenicidad de, por lo menos,  $10^5$  veces comparado con Lacprodan 80.

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

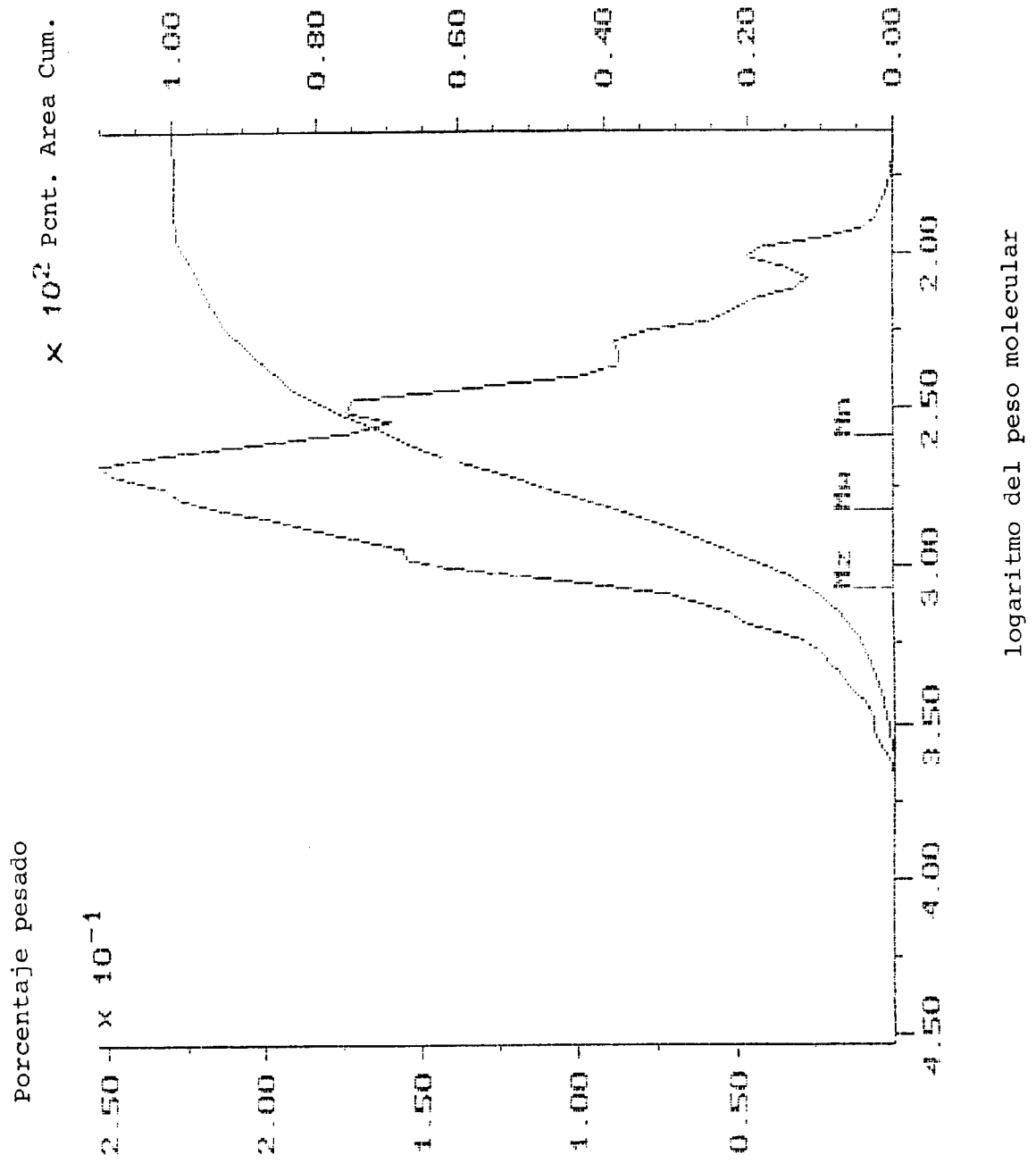


FIG. 1

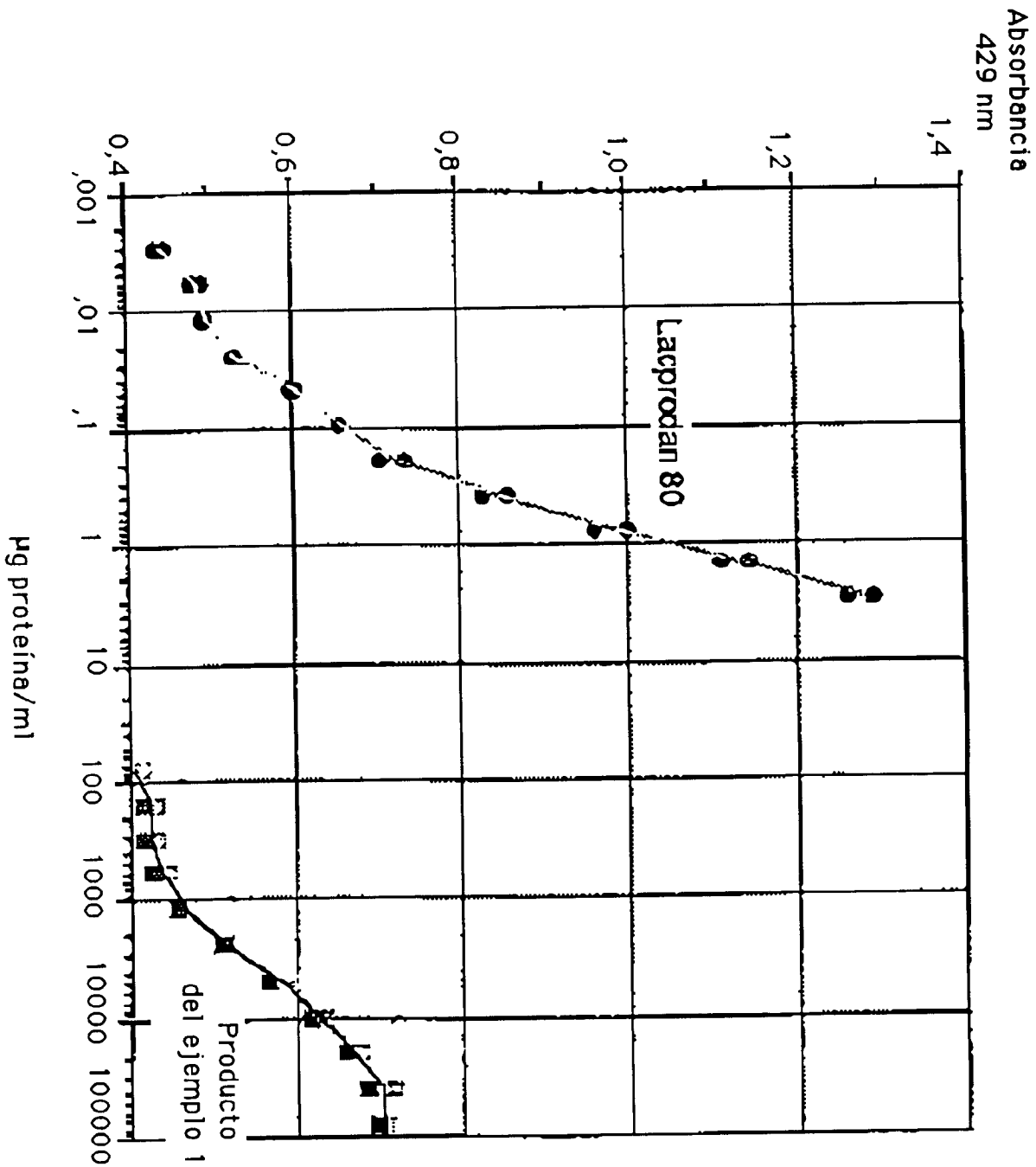


Figura 2