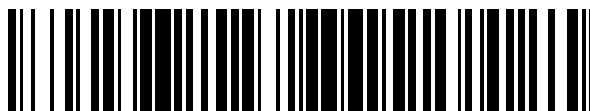


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 990**

51 Int. Cl.:

**A23L 1/23** (2006.01)

**A23L 1/238** (2006.01)

**A23J 3/34** (2006.01)

**C12R 1/225** (2006.01)

**C12R 1/245** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01917126 .3**

96 Fecha de presentación: **03.04.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1274318**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.01.2003**

54 Título: **HIDROLIZADO CULTIVADO DE PROTEÍNA.**

30 Prioridad:  
**07.04.2000 EP 00201274**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**24.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**24.11.2011**

73 Titular/es:  
**NESTEC S.A.**  
**AVENUE NESTLÉ 55**  
**1800 VEVEY, CH**

72 Inventor/es:  
**JAEGER, Daniel;**  
**HERING-GIOVANOLA, Cristina y**  
**AFFOLTER, Michael**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 368 990 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCION**

Hidrolizado cultivado de proteína

- 5 En la patente US nº 5.965.178, Baensch et al., describen un procedimiento para la producción de un condimento el cual comprende la preparación de un koji fermentado que contiene proteínas y materiales de hidratos de carbono, y a continuación se hidroliza el material de koji en presencia de un cultivo de bacterias de ácido láctico. La composición del condimento se obtiene sin preparar un moromi.
- 10 Otros hidrolizados biológicos de proteína vegetal para emplear como sustancias neutras para dar cuerpo, como bases para sabores procesados, en aplicaciones culinarias como caldos, sopas y salsas, se desarrollan al igual que los condimentos líquidos.

El problema es que los hidrolizados biológicos son por regla general más caros de obtener que el HPP debido a que se obtienen unos menores rendimientos, con un mayor coste del equipo, y un precio más caro de las materias primas, por ejemplo, enzimas (comerciales o de propia producción por fermentación).

Es también conocida la hidrólisis enzimática del gluten de trigo empleando enzimas que se encuentran en el comercio. Los puntos críticos en el desarrollo de procedimientos para el hidrolizado del gluten de trigo (con enzimas autorizadas para alimentos), son principalmente los altos costes de estas enzimas, la separación de sólidos a partir de los hidrolizados con alto rendimiento y protección microbiológica de los hidrolizados puesto que están obtenidos con una concentración baja de sal o incluso sin ella, a temperaturas que permiten cierto deterioro de los microorganismos.

Finalmente, la patente US nº 3. 852. 479 se refiere a un hidrolizado de proteína con un alto contenido en ácido glutámico. Dicho hidrolizado comprende el empleo de una glutaminasa y una enzima. Sin embargo, un paso esencial de este procedimiento es el empleo de un material "desnaturalizado" que contiene proteína, lo cual quiere decir que es un material que ha sido sometido a un tratamiento de desnaturalización como por ejemplo un tratamiento térmico.

La presente invención reivindica proporcionar un procedimiento natural y de "tecnología suave", para preparar condimentos, lo cual es muy deseado por los consumidores de estos días.

**30 Resumen de la invención**

Sorprendentemente, se ha descubierto que algunas cepas de bacterias del ácido láctico empleadas en combinación con enzimas pueden tener una actividad sinérgica en la producción de bases saborizantes las cuales dan un buen cuerpo y contienen cantidades significativas de MSG (glutamato mono sódico) "producidas en el proceso" o bien ACIDO GLUTAMICO. En la presente especificación, MSG se refiere o bien al glutamato monosódico o bien al ácido glutámico.

En consecuencia, esta invención proporciona un procedimiento para la producción de una base saborizante cultivada, el cual comprende la hidrólisis de un material que contiene proteína, empleando una combinación de por lo menos una enzima con por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico estable a la temperatura, seleccionada por su capacidad de proporcionar una actividad glutaminasa.

En una versión preferida, la enzima es, por ejemplo, cualquier endo- o exo-peptidasa y/o proteasa, desaminasa, transaminasa o amiloglucosidasa técnica, autorizada para alimentos.

En una versión preferida, las bacterias del ácido láctico se emplean en forma de un iniciador (inóculo). Las bacterias lácticas pueden seleccionarse a partir del grupo formado por los Lactobacilli facultativos hétérofermentativos, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrucki*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sp.*

50 En la versión más preferida, la cepa de bacterias del ácido láctico es el *Lactobacillus rhamnosus* (NCC 858) (CNCM I - 2433).

El ratio enzimas : bacterias del ácido láctico es de preferencia aproximadamente desde 1 : 1, hasta aproximadamente 4 : 1, basado sobre el 1% (peso/peso) de adición de los ingredientes.

55 La hidrólisis puede efectuarse durante el tiempo suficiente para que las bacterias del ácido láctico produzcan desde el 1 hasta el 4% de MSG ó ACIDO GLUTAMICO en los hidrolizados o para tener un DH de por lo menos el 20. La hidrólisis del material que contiene la proteína se efectúa así de preferencia a una temperatura de por lo menos aproximadamente 30-50°C. El pH se mantiene de preferencia entre aproximadamente 5 y 6. La reacción puede efectuarse durante por lo menos 12 horas.

60 El hidrolizado puede además ser procesado corriente abajo por medios de inactivación térmica, filtración y/o

centrifugación para producir una salsa en crudo. En una versión preferida, el hidrolizado se pasteuriza, se añade sal y el hidrolizado se filtra para separar los sólidos de la fase líquida.

El procedimiento de acuerdo con la presente invención tiene numerosas ventajas. Compete eficientemente con los microorganismos de deterioro, como las bacterias coliformes. Se obtiene por completo una buena y biológica hidrólisis del material de proteína. Además es un procedimiento más corto que cualquier otro procedimiento para hidrolizados biológicos descrito hasta la fecha.

Además, el procedimiento más arriba mencionado emplea efectos sinérgicos de las enzimas añadidas (proteasas, peptidasas) con las enzimas proporcionadas por las bacterias del ácido láctico. Comparados con hidrolizados similares, producidos solamente por enzimas, los hidrolizados cultivados muestran un mayor grado de hidrólisis y un mayor rendimiento de glutamato monosódico (MSG).

Otro principal objeto de la presente invención se refiere a una cepa de bacterias del ácido láctico (LAB) estable a la temperatura, seleccionada por su capacidad de proporcionar una actividad glutaminasa. La cepa seleccionada puede eliminar azúcares reductores como por ejemplo la glucosa y la maltosa. La cepa LAB puede también proporcionar una mayor liberación de la prolina y del MSG ó del ACIDO GLUTAMICO, de los enlaces peptídicos.

En una versión preferida, la cepa de bacterias del ácido láctico, se selecciona a partir del grupo formado por los Lactobacilli facultativos heterofermentativos, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sp.*

En una de las versiones más preferidas, la cepa de bacterias del ácido láctico, es el *Lactobacillus rhamnosus* (NCC 858) (CNCM I-2433).

En un último aspecto, la invención se refiere al empleo de cepas de bacterias del ácido láctico (LAB) estable a la temperatura, que tienen las características anteriores, como microorganismos del procedimiento para la preparación de condimentos.

Las cepas de acuerdo con la presente invención, proporcionan una protección microbiológica del procedimiento y una significativa eliminación de los azúcares reductores lo cual conduce a una disminución de las reacciones Maillard incontroladas, lo cual aumenta la estabilidad de la vida útil del producto y su aplicabilidad.

Además, las cepas seleccionadas, no perjudican la sensación de cuerpo ni el sabor característico del hidrolizado, sino que incluso contribuyen a aumentar la sensación de cuerpo y sabor (mayor grado de hidrólisis, mayor rendimiento en MSG ó en ACIDO GLUTAMICO).

#### Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción, la abreviatura "ufc" ("unidades formadoras de colonias") significa el número de células bacterianas, las cuales pueden determinarse mediante contajes microbiológicos sobre placas de agar.

En la especificación, todos los porcentajes están dados sobre la base de peso, excepto en donde se establece específicamente otra cosa.

Como un marcador de la calidad para monitorizar la eficiencia de la hidrólisis de la proteína, se formula el grado de hidrólisis (DH), el cual es :  $DH = \frac{(\text{concentración del nitrógeno de } \alpha\text{-amino libre} \times 100)}{\text{concentración del nitrógeno total}}$ .

Además, "NCC" significa Colección de Cultivos Nestlé (Nestlé Research Center, Vers-chez-les-Blanc, Lausanne, Suiza).

Con respecto al primer objeto de la presente invención, el material que contiene la proteína es de origen vegetal o animal. El material de proteína vegetal puede ser por ejemplo, gluten de trigo, granos de soja desengrasados, semillas de soja desengrasadas, gluten de maíz, gluten de arroz, torta a presión de girasol. De preferencia es gluten de trigo. El material de proteína animal, como por ejemplo, las proteínas lácteas, carne de pollo, buey o cerdo puede también emplearse como sustrato en el procedimiento presente. El material que contiene la proteína se emplea de preferencia, seco, en forma de polvos, o en forma de granos.

El material que contiene la proteína se mezcla con agua de manera que se obtenga una papilla/ lechada. La lechada resultante se somete a continuación a una hidrólisis empleando una combinación de por lo menos una enzima con por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico estable a la temperatura seleccionada por su capacidad para proporcionar una actividad glutaminasa.

- La enzima, de acuerdo con lo presente invención, puede ser una endo- o una exo-peptidasa, desaminasa, transaminasa, glutaminasa o amiloglucosidasa, por ejemplo. De preferencia se usan el Flavorzyme®, la Alcalase®, el Dextrozyme®, el AMG®. Estas enzimas fueron proporcionadas por NOVOZYMES NORDISK FERMENT Ltd. (Novo Nordisk Ferment AG, Dittigen, Suiza). La enzima puede emplearse sola o en combinación. La enzima puede
- 5 emplearse en una cantidad que puede variar de acuerdo con la naturaleza de la enzima empleada. Si se emplea una proteasa, la cantidad es de preferencia por lo menos de un 1 % en peso basado sobre el gluten de trigo y de preferencia desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 4%. Si se emplea una carbohidrasa, la cantidad es de preferencia desde próximamente por lo menos un 0,01% en peso basado sobre el gluten de trigo.
- 10 Por lo menos se emplea una cepa de bacterias del ácido láctico (LAB) estable a la temperatura, en combinación con la enzima. La cepa de bacterias del ácido láctico tiene las características que se describen más adelante. Puede seleccionarse del grupo formado por los Lactobacilli facultativos heterofermentativos, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, y *Lactobacillus rhamnosus* de los cuales el más preferido es el *Lactobacillus rhamnosus* (NCC 858) (CNMC I-2433).
- 15 La cepa de bacterias del ácido láctico seleccionada se añade ventajosamente en forma de un iniciador que da por resultado un título de aproximadamente  $10^4$  hasta aproximadamente  $10^7$  ufc/g en el hidrolizado al principio de la reacción. El iniciador puede añadirse a la reacción del hidrolizado en una cantidad de por lo menos 0,1% (v/v) y de preferencia desde aproximadamente 0,5 hasta 2% (v/v), o la cantidad de hidrolizado al principio de la reacción es de
- 20 preferencia desde aproximadamente  $5 \times 10^5$  hasta aproximadamente  $2 \times 10^6$  ufc/g.
- El ratio enzima : bacterias del ácido láctico es de preferencia desde 1:1 hasta 4:1 basado en el % (p/p) de adición de los ingredientes.
- 25 En una versión preferida, el presente procedimiento se efectúa mediante la hidrólisis del material que contiene la proteína, mezclando del 15 al 30% del material que contiene la proteína, en el 65 ó el 80% de agua para obtener una lechada, añadiendo a continuación a la lechada desde un 1,0% hasta un 4,0% (basado sobre el gluten de trigo) de por lo menos una enzima y desde un 0,1% hasta un 1% de un iniciador (un inóculo) de por lo menos una cepa de bacterias del ácido láctico con un título de  $10^9 - 10^{11}$  ufc/g (en el cultivo de partida concentrado). Los porcentajes
- 30 están dados en peso basado sobre la reacción total.
- La hidrólisis del material que contiene la proteína puede efectuarse a una temperatura de por lo menos 43 °C, y de preferencia desde 45 hasta 48 °C. El pH puede ser de 5 a 6. El pH puede ser mantenido añadiendo tampón de acetato pH o carbonato de calcio, por ejemplo en el margen de pH 5 - 6.
- 35 La hidrólisis se efectúa de preferencia durante un tiempo suficiente para que la cepa de ácido láctico crezca un 2-3 log, o para crear un 1-4% de glutamato monosódico o ácido glutámico en el hidrolizado, o para tener un grado de hidrólisis (DH) de por lo menos un 20%.
- 40 En una versión preferida, la hidrólisis puede efectuarse durante por lo menos 12 horas y con mayor preferencia desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 24 horas.
- Durante esta hidrólisis de la proteína, se liberan azúcares reductores, debido a las actividades secundarias enzimáticas de las preparaciones comerciales de la enzima. Los azúcares reductores son socios de reacción en las
- 45 reacciones Maillard y pueden ocasionar por ello el pardeado y la creación de notas amargas durante el almacenamiento. La bacterias del ácido láctico seleccionadas, las cuales son estables a la temperatura, eliminan la glucosa y la maltosa pero no perjudican la función de las enzimas del proceso ni producen sabores desagradables. Debido a la eliminación de los azúcares, la cepa de bacterias del ácido láctico funcionará también como un cultivo protector y tiene actividad antimicrobiana contra las bacterias gram negativas y gram positivas. El hidrolizado
- 50 obtenido a continuación es bajo en azúcares reductores. La glucosa puede eliminarse completamente durante la hidrólisis, mientras que la concentración de la maltosa puede ser parcialmente reducida.
- A continuación, el hidrolizado puede ser tratado de diferentes maneras, con el fin de preparar un líquido, una pasta, o un polvo como ya es convencionalmente conocido.
- 55 En una versión preferida, el hidrolizado se seca (secado al vacío a 60-90°C, a aproximadamente de 15 a 4 mbares durante por lo menos 3 horas, o se seca por pulverización en un secador Niro de pulverización a una temperatura en la entrada de aire de 140 °C-180 °C y una temperatura en la salida de aire de aproximadamente 90 °C, de manera que se obtenga un polvo con un contenido en materia seca de por lo menos un 98%. La base sabrosa obtenida
- 60 puede emplearse por ejemplo en aplicaciones saborizantes del proceso, o alternadamente, el hidrolizado puede emplearse como un condimento líquido.
- En otra versión, puede añadirse hasta el 15% de NaCl después de la hidrólisis, y el hidrolizado puede calentarse hasta aproximadamente 90 °C y mantenerse a esta temperatura durante aproximadamente 10 minutos para inactivar
- 65 las enzimas y la actividad metabólica microbiana (pasteurización).

En otra versión, el hidrolizado inactivado se enfría y se mantiene a aproximadamente a 55 °C, y a continuación se filtra, o bien a través de filtros de placas y marcos, o bien alternativamente empleando un filtro prensa Hoesch. Después de la filtración se obtiene una salsa cruda transparente con un TS de 30-35%.

5 Con el fin de estabilizar todavía más la salsa cruda, puede hacerse reaccionar mediante la incorporación de cisteína en una cantidad desde 0,01 hasta 0,1 partes en peso, y a continuación mediante tratamiento térmico de la mezcla desde 95 °C hasta 110 °C durante 1 a 5 horas, como se describe en la patente US nº 5. 480. 663.

10 La hidrólisis del cultivo produce un hidrolizado con un buen cuerpo redondo (sabor en boca), con un buen potencial para dar cuerpo, y con un menor contenido en azúcares reductores.

Además, dicho bajo nivel de azúcares reductores conduce a menos reacciones Maillard incontroladas lo cual aumenta la estabilidad de la vida útil del producto.

15 Los hidrolizados se prepararon también empleando solamente enzimas. Se ha mostrado que dichos hidrolizados contienen altas concentraciones de substancia reductoras y carecen del lactato que se produce durante las hidrólisis cultivadas. Los hidrolizados cultivados de acuerdo con la presente invención muestran un aumento del grado de hidrólisis y un rendimiento mayor de MSG ó ACIDO GLUTAMICO. El proceso de hidrólisis de la proteína cultivada parece ser un sistema autorregulado, en donde los parámetros, concentración de la enzima, dosificación del inóculo, la actividad metabólica del microorganismo, el pH de la reacción, y la temperatura están en un equilibrio dinámico entre sí.

20 Los hidrolizados de acuerdo con la presente invención son buenos candidatos para dar un buen cuerpo a los sabores del proceso y aplicaciones culinarias (ver ejemplo).

25 En una versión preferida, el hidrolizado cultivado se emplea directamente en su forma líquida o seca, de forma que potencia o imparte un sabor sabroso tipo, por ejemplo en los productos culinarios,. La cantidad de la forma líquida es de preferencia desde aproximadamente 0,05 hasta 750 g por kg de producto culinario o producto para animales domésticos, en función de la intensidad del sabor requerido. La forma seca del agente saborizante puede ser empleada en una cantidad desde 0,2 hasta 250 g por kg de producto.

30 De acuerdo con otro objeto de la presente descripción, fueron examinadas varias cepas de bacterias de ácido láctico (LAB) estables a la temperatura, de acuerdo con sus propiedades y parámetros físicos: calidad alimenticia y estatus GRAS, capacidad para metabolizar tanto la glucosa como la maltosa, tolerancia termica entre 40 °C y 55 °C.

35 Las cepas LAB seleccionadas son de calidad alimenticia. Son estables a la temperatura (es decir crecen entre 40° C - 55 °C), y crecen en / se aíslan a partir de vegetales. Tienen también la capacidad de metabolizar la glucosa y la maltosa. No perjudican la función de las enzimas del proceso, ni las características de cuerpo y de sabor típicos de los hidrolizados y no producen olores desagradables.

40 En una versión preferida, la LAB se selecciona del grupo formado por los facultativos heterofermentativos *Lactobacillus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* y otros *Lactobacillus sp.*, por ejemplo.

45 En una versión más preferida, la LAB es el *Lactobacillus rhamnosus* NCC 858 (CNCM) I-2433).

50 La cepa *Lactobacillus rhamnosus* (NCC 858) fue depositada a título de ejemplo, bajo el tratado de Budapest, en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes ("Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos" (CNCM), Instituto Pasteur, 28 calle del doctor Roux 75724 París Cedex 15, Francia, el 5 de abril de 2000, con la referencia CNCM I-2433.

#### CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE LA CEPA SELECCIONADA

##### **Lactobacillus rhamnosus (NCC 858)**

- 55
- microorganismo gram positivo, sin motilidad, sin esporas,
  - células con forma de varillas, de 0,8 - 1 µm a 2 - 4 µm, a menudo con extremos cuadrados, solas, o formando cadenas cortas.
  - Microorganismos microaerofílicos con metabolismo facultativo heterofermentativo, producción de L (+) ácido láctico.
  - Catalasa negativa, producción de CO<sub>2</sub> facultativa
  - Fermentación de azúcares: amigdalina (+), arabinosa (+/-) celobiosa (+), esculina (+), gluconato (+), manitol (+), melecitosa (+), melibiosa (-), rafinosa (-), ribosa (+), sorbitol (+), sucrosa (+), xilosa (+).
  - Posible crecimiento hasta 48 °C.
- 60
- 65

En otra versión, la invención se refiere al empleo de cepas de bacterias del ácido láctico (LAB) estables a la

temperatura, que tienen las características anteriores como microorganismos de proceso para la preparación de condimentos. Las LAB seleccionadas pueden emplearse en un procedimiento para la preparación de bases sabrosas como se ha descrito más arriba, por ejemplo. Sorprendentemente se descubrió que empleando el cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* NCC 858 por ejemplo, se podía eliminar el empleo de la glutaminasa técnica para la conversión de la glutamina en glutamato. Adicionalmente el NCC muestra también alguna actividad proteolítica.

Las cepas LAB de acuerdo con la presente invención no perjudican la sensación de cuerpo y sabor característicos del hidrolizado sino que incluso contribuyen a un cuerpo y sabor mejorados (mayor grado de hidrólisis, mayor rendimiento en MSG ó ACIDO GLUTAMICO). Las cepas de LAB pueden también proporcionar una protección microbiológica del proceso saborizante y una significativa eliminación de los azúcares reductores conduciendo a menos reacciones Maillard incontroladas, lo cual aumenta la estabilidad de la vida útil del producto.

Los siguientes ejemplos se dan solamente a título de ilustración y de ninguna manera se formulan como limitación del asunto objeto de la presente solicitud.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

La cepa NCC 858 se empleó para los experimentos iniciales para ajustar las condiciones de reacción adecuadas. Para los ensayos iniciales, el pH de la reacción se mantuvo a 5,8 mediante dosificación de NaOH al sistema. La reacciones se basaron en la siguiente receta:

Ingredientes	% (p/p) basado sobre la reacción total	
Gluten de trigo	22	
Agua		76,25
Flavorzyme® (basado en gluten de trigo)	1	
Glutaminasa C200® (basado en gluten de trigo)	0,1	
Tampón de acetato, de pH 5,8	0,25	
Iniciador LAB		5. 10 <sup>5</sup> ufc/g (0,4%)

La tabla 1 resume los resultados del ensayo de crecimiento con NCC 858, para encontrar el crecimiento óptimo y la temperatura de reacción en un proceso de hidrolizado de gluten de trigo cultivado.

**Tabla 1: Ensayo de crecimiento en un medio de proceso cultivado**

Temp <sup>1</sup> .	Ufc/g <sup>2</sup> [0 h]	Ufc/g <sup>2</sup> [16 h]	RS <sup>3</sup> [0 h]	RS <sup>3</sup> [16 h]	DH <sup>4</sup> [16]
45 °C	1. 10 <sup>6</sup>	1. 5. 10 <sup>9</sup>	Glc 0,3% Mal 1%	Glc < 0,05% Mal 0,3%	23-27%
55 °C	1. 10 <sup>6</sup>	3. 10 <sup>2</sup>	Glc 0,3% Mal 1%	Glc 0,48% Mal 1,2%	23-26%

<sup>1</sup> temperatura de la reacción de hidrólisis,  
<sup>2</sup> se indican las cuentas del NCC 858 en el hidrolizado. Para coliformes, bascilli, y esporas, las cuentas fueron < 10 ufc/g después de 16 horas,  
<sup>3</sup> azúcares reductores,  
<sup>4</sup> grado de hidrólisis como ratio entre el nitrógeno del α-amino libre y la concentración de nitrógeno total.

Los resultados mostraron claramente (concentraciones de ufc y azúcares) que a 45 °C hay un buen crecimiento de los microorganismos durante las 16 horas de la hidrólisis. Los subsiguientes hidrolizados han mostrado sin embargo que las temperaturas hasta 47 °C son toleradas por la cepa NCC 858. La monitorización del grado de hidrólisis muestra que la eficiencia de la hidrólisis de las enzimas es eficiente a 45 °C como lo es a 55 °C .

#### • Determinación del posible margen de dosificación para el iniciador del NCC 858 en un proceso de hidrolizado de gluten de trigo cultivado

Se ha demostrado que un margen de dosificación para los inóculos, entre 1.10<sup>4</sup> ufc/g y 1.10<sup>6</sup> ufc/g, no tiene una influencia negativa sobre la hidrólisis.

La monitorización microbiológica para los coliformes, AMC y AMS, demostró que se había ejercido una buena protección por el NCC 858 en todo el margen de dosificación completo. Las dosificaciones inferiores a 1. 10<sup>4</sup> ufc/g no fueron ensayadas, en estos casos el inóculo no puede dominar más la flora de contaminación presente en el

material en crudo.

● **Proceso de hidrólisis cultivado con Flavorzyme®/Alcalasa® como enzimas únicas**

5 El margen de dosificación de 1- 3% de Flavorzyme® se ensayó en estas series. La Alcalasa® se añadió a 0,1% en todos los ensayos. La receta para el hidrolizado es por otra parte idéntica a la ya descrita más arriba.

10 La tabla 2 muestra la comparación de los valores analíticos para los ensayos más arriba citados, las versiones enzimáticas del hidrolizado de gluten de trigo. Como valores de referencia se emplearon el 2% de Flavorzyme®, el 0,1% de Alcalase® y el 4% de Flavorzyme®, el 1% de Glutaminase C200®, y el 0,1% de Alcalase®).

**Tabla 2: Comparación de los resultados analíticos del proceso empleando Flavorzyme® / Alcalase® como las únicas enzimas a diferentes dosificaciones.**

	Dosificación del inóculo Ufc/g	Concentración de las enzimas	MSG <sup>5</sup>	DH <sup>1</sup>	Glc <sup>3</sup> /Mal <sup>4</sup>	RS <sup>2</sup>	DM
			[% p/p]				
Hidrolizado no cultivado	No	2% de Flav 0,1% de Alc	0,27	24,55	n.a / n.a.	1,83	32,9
Hidrolizado cultivado	2. 10 <sup>5</sup>	2% de Flav 0,1% de Alc	2,67	32,71	0,0 5/0,72	1,02	32,3
Hidrolizado cultivado	5.10 <sup>5</sup> – 1.10 <sup>6</sup>	2% de Flav 0,1% de Alc	2,49	30,6	0/0,67	0,93	32,3
Hidrolizado cultivado	2. 10 <sup>6</sup>	1% de Flav 0,1% de Alc	1,34	22,96	0.05/0,69	0,93	31,4
Hidrolizado cultivado	2. 10 <sup>6</sup>	3% de Flav 0,1% de Alc	2,9	33,04	0/0,58	1,05	33,4 de
Hidrolizado no cultivado	No	4% de Flav, 1% de Gln 0,1% de Alc	3,2	35,7	n.a. / n.a.	2,24	29,7

<sup>1</sup> grado de hidrólisis,  
<sup>2</sup> sustancias reductoras (azúcares y otros),  
<sup>3</sup> glucosa,  
<sup>4</sup> maltosa,  
<sup>5</sup> glutamato monosódico, Flav: Flavorzyme®, Gln: Glutaminasa, Alc: Alcalase®.

15 Los datos de la tabla 2 muestran claramente que los hidrolizados obtenidos solamente con el 2% de Flavorzyme® y solamente con el iniciador NCC 858, producen buenos niveles de los marcadores de calidad MSG ó ACIDO GLUTAMICO y DH. Los datos son comparables a las condiciones del proceso en donde se obtuvo un hidrolizado con el 2% de Flavorzyme® y el 0,75% de glutaminasa (Glutaminase C200®) e iniciador NCC858 (datos no mostrados). En otras palabras, la adición de glutaminasa comercial no aumentó el rendimiento del MSG ó del ACIDO GLUTAMICO, ó el grado de hidrólisis en el proceso cultivado.

20 El procedimiento empleando solamente un 2% de Flavorzyme y un 0,1% de Alcalasa pero ningún iniciador, da como resultado un grado significativamente más bajo de hidrólisis y solamente unos niveles base de MSG ó ácido glutámico.

25 Las condiciones del proceso empleando un 3% de Flavorzyme, un 0,1% de Alcalasa e iniciador NCC858, muestran unos resultados comparables a los obtenidos al emplear un 4% de Flavorzyme, un 0,1% de Alcalasa, y un 1% de Glutaminasa C200.

30 Resumiendo, la adición del iniciador NCC858 al sistema de hidrólisis, ayuda a reducir la cantidad de Flavorzyme® y

permite eliminar la glutaminasa comercial de la producción del hidrolizado de gluten de trigo cultivado.

**Ejemplo 2: Preparación de una base sabrosa (o hidrolizado seco cultivado)**

5 Con el fin de preparar un hidrolizado cultivado de gluten de trigo, se mezcla el 22% de trigo en 75,65% de agua para obtener una lechada. La lechada obtenida se hidroliza a continuación mediante la adición de un 1% de Flavorzyme® (basado en gluten de trigo) y 0,1% de Alcalase® y un 1% de un iniciador de *Lactobacillus rhamnosus* (NCC 858) (CNCM I- 2433) con un título de  $5 \times 10^3$  ufc/g.

10 El pH para la hidrólisis se mantiene aproximadamente a 5,8 mediante la adición de tampón de acetato de un pH 5,8 a 0,25% (p/p) y la reacción se efectúa a 45-48°C durante 16 horas de forma que se obtenga el hidrolizado cultivado.

A continuación el hidrolizado se seca al vacío a 66 °C aproximadamente de 15 a 4 mbars durante  $\geq 3$  horas de forma que se obtenga un polvo. El polvo tiene un contenido en materia seca de por lo menos el 98%. Este polvo puede emplearse como se describe en el ejemplo 5.

15

**Ejemplo 3: Preparación de una salsa en crudo (base sabrosa líquida)**

Se prepara un hidrolizado cultivado como se ha descrito en el ejemplo 2. Después de la hidrólisis se añade un 15% de NaCl. A continuación el hidrolizado se calienta hasta aproximadamente 90 °C y se mantiene a esta temperatura durante aproximadamente 10 minutos para inactivar las enzimas y la actividad metabólica microbiana (pasteurización).

20

El hidrolizado inactivado se enfría y se mantiene aproximadamente a 55 °C y a continuación se filtra empleando un filtro prensa Hoesch. Después de la filtración, se obtiene una salsa en crudo clarificada con un TS de 30 -35 %. Esta salsa en crudo puede ser empleada para la preparación de condimentos (ver ejemplo 4).

25

La salsa en crudo puede también evaporarse y secarse al vacío y a continuación molerse para obtener un polvo. Este polvo puede emplearse a continuación en aplicaciones culinarias y saborizantes como se muestra en los ejemplos 5 y 6.

**30 Ejemplo 4: Condimento líquido**

Con el fin de preparar un condimento líquido se mezclan los siguientes ingredientes juntamente en un reactor con agitación:

35	Ingrediente	[%]
	Hidrolizado de gluten de trigo cultivado con enzimas	50
	Agua	33,8
40	Sal	13
	Acido acético	0,5
	Sabor a lovage	0,1
	MSG	2,0
	Color caramelo	0,6

45

La mezcla se pasteuriza después a una temperatura de 95 °C durante 15 minutos y, a continuación, el condimento se transfiere a botellas de color pardo para el almacenamiento y los ensayos de aplicación.

**Ejemplo 5: Aplicación en un producto culinario (sopa)**

50

Este ejemplo demuestra que el empleo del polvo hidrolizado cultivado preparado como en el ejemplo 2, tiene un ingrediente saborizante para una aplicación culinaria (sopa de setas). La sopa tiene la siguiente composición:

55	Ingrediente	[%]
	Polvo de cebolla	0,5
	Hidrolizado de gluten de trigo Cultivado con enzimas (polvo)	13,6
	Almidón modificado	12,0
	Leche desnatada en polvo	11,4
60	Harina de trigo	13,0
	Sal	2,4
	Polvo de setas	6,5
	Crema de leche no grasa	11,6



## ES 2 368 990 T3

Maltodextrina	18,0
Grasa	11

5 Todos los ingredientes se mezclan juntos en un mezclador convencional. La sopa es un polvo culinario seco. 100 g de polvo se mezclan con 800 ml de agua y 200 ml de leche parcialmente descremada, y se cuecen durante cinco minutos (a fuego lento).

### **Ejemplo 6: Composición para un pienso para animales domésticos**

10 Se prepara una mezcla del 70% de canal de pollo, pulmones de cerdo y hígado de buey (molido), 18% de harina de trigo, 8% de agua, y 0,2% de hidrolizado líquido cultivado como se ha preparado en el ejemplo 2, vitaminas y sales inorgánicas.

15 La mezcla se emulsiona a 12 °C y se extrusiona en forma de un pudín, el cual se cuece a continuación a una temperatura de 90 °C . Se enfría a 30 °C y se corta a trozos. Un 45% de estos trozos se mezclan con un 55% de una salsa preparada con un 98% de agua, un 1% de colorante y un 1% de goma guar. Se llenan latas de hojalata y se esterilizan a 125 °C durante 40 minutos.

Este pienso para animales domésticos tiene un olor agradable, como se percibe al oler la muestra.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una base saborizante cultivada, el cual comprende la mezcla de un material que contiene proteína con agua, para formar una papilla o lechada e hidrolizándola empleando una combinación de por lo menos una enzima con por lo menos una cepa de bacterias de ácido láctico estables a la temperatura, seleccionadas por su capacidad para proporcionar una actividad glutaminasa.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el hidrolizado se procesa además corriente abajo, por medio de una inactivación térmica, filtración y /o centrifugación para producir una salsa en bruto.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el material que contiene la proteína es de origen vegetal o animal.
4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el material que contiene la proteína es gluten de trigo, proteína de arroz, soja, gluten de maíz, torta prensada de girasol, proteínas de la leche y proteínas animales.
5. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el ratio enzima / cepa de bacterias del ácido láctico, es de 1 : 1 a 4 : 1 basado sobre el % (p/p) de adición de los ingredientes.
6. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en el cual la enzima es una exo o endoproteasa, desaminasa, carbohidrasa o amiloglucosidasa.
7. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual la enzima se emplea en una cantidad de por lo menos un 0,2% (proteasa) ó 0,05 % (carbohidrasa) en peso, basado sobre la reacción total.
8. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, en el cual la bacteria de ácido láctico estable a la temperatura se selecciona del grupo formado por *Lactobacilli* facultativos heterofermentativos, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* o *Lactobacillus sp.*
9. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la bacteria de ácido láctico es el *Lactobacillus rhamnosus* (NCC 858) CNCM1-2433.
10. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual la bacteria de ácido láctico se añade en forma de un iniciador, con un título de  $1 \cdot 10^8 - 1 \cdot 10^{11}$  ufc/g, en una cantidad de por lo menos desde un 0,1 hasta un 0,5% (p/p).
11. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la hidrólisis se efectúa durante un tiempo suficiente para que la cepa de bacterias lácticas crezcan un 2-3 log, o produzcan 1 - 4% de glutamato monosódico (MSG) en el hidrolizado, o tengan un grado de hidrólisis (DH) de por lo menos un 20%.
12. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, en el cual la hidrólisis se efectúa a 43 °C - 48 °C, a un pH de 5 - 6 durante un tiempo de por lo menos 12 horas.
13. Un procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 9, en donde una lechada que contiene de 15 a 30% del material que contiene la proteína, y de un 65 a un 80% de agua, se hidroliza empleando de 1 a un 4% de por lo menos una enzima combinada con un 0,5 a un 2% del iniciador de bacterias de ácido láctico con un título de  $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$  ufc/g, en una cantidad de por lo menos un 0,1 a un 0,5% (p/p).
14. Empleo de una base sabrosa preparada de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, como un cuerpo para dar sabor a un proceso.
15. Empleo de una base sabrosa preparada de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 13, para la preparación de condimentos, saborizantes, y productos culinarios o piensos para animales domésticos.
16. Una cepa aislada de cultivo iniciadora de bacterias de ácido láctico estable a la temperatura, seleccionada por su capacidad para proporcionar una actividad glutaminasa.
17. Una cepa aislada de acuerdo con la reivindicación 16, la cual se selecciona del grupo formado por los *Lactobacilli* facultativos heterofermentativos, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, y *Lactobacillus rhamnosus*.
18. Una cepa aislada de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17, la cual es el *Lactobacillus rhamnosus* (NCC 858) CNCM1 - 2433.
19. Empleo de una cepa aislada de bacterias de ácido láctico de acuerdo con una de las reivindicaciones 16 a 18,

como procedimiento para un microorganismo para la preparación de condimentos, saborizantes y productos culinarios o productos para un animal doméstico.

20. Empleo de una cepa aislada de acuerdo con la reivindicación 19, en combinación con por lo menos una enzima.

5 21. Empleo de acuerdo con la reivindicación 19 ó 20, en donde el ratio enzima : cepa de bacterias de ácido láctico es de 1 : 1 a 4 : 1, basado sobre el % (p/p) de adición de los ingredientes.