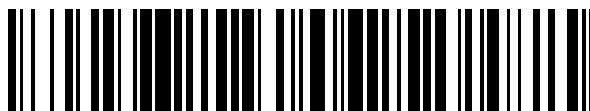


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 854**

51 Int. Cl.:
A23L 1/305 (2006.01)
A23J 3/34 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08736283 .6**
96 Fecha de presentación: **16.04.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2146589**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.01.2010**

54 Título: **HIDROLIZADO PROTEICO DE LACTOSUERO.**

30 Prioridad:
16.04.2007 US 911935 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.02.2012

73 Titular/es:
**NOVOZYMES A/S
KROGSHÖJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:
**LYNGLEV, Gitte, Budolfsen y
NIELSEN, Per, Munk**

74 Agente: **Tomas Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 374 854 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).

DESCRIPCIÓN

Hidrolizado proteico de lactosuero

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a un método para la producción de un hidrolizado proteico de lactosuero usando una endopeptidasa microbiana.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Suplementos de proteína, como polvo de proteína de lactosuero, se utilizan comúnmente por culturistas y otros atletas para acelerar el desarrollo muscular y la ayuda en la recuperación.

15 Asimismo, estos suplementos de proteína son útiles para nutrición clínica.
 En general, predigeridas, las proteínas de lactosuero parcialmente hidrolizadas se absorben más fácilmente que las proteínas no hidrolizadas, porque los hidrolizados de proteínas se considera que tienen beneficios nutritivos. Pero mientras que la proteína de lactosuero no hidrolizada tiene un sabor a leche de moderado a ligero, la proteína de lactosuero hidrolizada tiende a saber bastante diferente, normalmente de manera que muchos la encuentran indeseable. Por lo tanto, cuando estos hidrolizados se usan en, por ejemplo, bebidas, el sabor tiene que ser enmascarado, por ejemplo, por adición de sabor artificial.

[0003] Hidrólisis de proteína usando endopeptidasas específicas se conoce en la técnica, ver, por ejemplo, WO97/43910 o US 5 866 357.

25 La hidrólisis de beta-lactoglobulina, que es una de las proteínas presentes en proteína de lactosuero, se ha estudiado en Madsen et al. (1997), *Int. Dairy Journal*, 7, pp. 399-409.

Hidrólisis de epítomos de beta-lactoglobulina con proteasas diferentes se describe también en *Food Proteins and Their Applications*; Ed. S. Damodaran & A. Paraf; Marcel Dekker, New York, 1997; pp. 443-472.

Resumen de la invención

30 [0004] Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente un método para la producción de un hidrolizado proteico de lactosuero, donde la proteína de lactosuero está sujeta a tratamiento con una endopeptidasa microbiana con especificidad para arginina y lisina, seguido de inactivación de la endopeptidasa, que da lugar a un hidrolizado con un sabor agradable.

35 El hidrolizado puede incluso tener un sabor mejor que la proteína de lactosuero no hidrolizada. Además, el hidrolizado proteico de lactosuero obtenido por el método de la invención es estable y tiene una tendencia reducida a gel sobre tratamiento térmico en comparación con hidrolizados obtenidos con otras endopeptidasas.

40 [0005] La presente invención, por lo tanto, se refiere a un método para la producción de un hidrolizado proteico de lactosuero comprendiendo:

- a) provisión de una composición acuosa de proteína de lactosuero comprendiendo beta-lactoglobulina y alfa-lactoalbúmina;
- 45 b) sometimiento de dicha composición a la acción de una endopeptidasa microbiana que específicamente divide en el lado carboxi-terminal de arginina o lisina; y
- c) inactivación de la endopeptidasa.

[0006] La presente invención también se refiere al uso de un hidrolizado proteico de lactosuero obtenido por el método de arriba en la nutrición clínica o en una bebida energética o una bebida deportiva.

50 Descripción detallada de la invención

[0007] Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención se refiere a un método para la producción de un hidrolizado proteico de lactosuero comprendiendo:

- 55 a) provisión de una composición acuosa de proteína de lactosuero comprendiendo beta-lactoglobulina y alfa-lactoalbúmina;
- b) sometimiento de dicha composición a la acción de una endopeptidasa microbiana que específicamente divide en el lado carboxi-terminal de arginina o lisina; y
- 60 c) inactivación de la endopeptidasa.

[0008] La proteína de lactosuero para usarse en el método de la invención debe entenderse como proteínas que pueden obtenerse de lactosuero, como proteínas aisladas del lactosuero.

65 El lactosuero puede definirse como la parte líquida que se separa cuando la leche coagula por ácido y/o cuajo. El lactosuero puede así ser un subproducto de producción de queso o de producción de caseína.

Leche en el contexto de la presente invención puede derivarse de cualquier mamífero, como vacas, cabras, oveja, burros, camellos, camélidos, yacs, o búfalos.

En un aspecto preferido, la leche es leche de vaca.

5 [0009] Proteína de lactosuero para ser usada en el método de la invención comprende beta-lactoglobulina y alfa-lactoalbúmina.

Puede también comprender otras proteínas obtenibles de lactosuero, como albúmina de suero.

La composición acuosa del paso a) puede también comprender otras proteínas que no son obtenibles de lactosuero.

10 [0010] En un aspecto preferido, la composición acuosa del paso a) comprende al menos 15%, tal como al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55% o al menos 60% de beta-lactoglobulina de materia seca total.

En otro aspecto preferido, la composición acuosa del paso a) comprende al menos 5%, tal como al menos 10%, al menos 15% o al menos 20% de alfa-lactoalbúmina de materia seca total.

15 En otro aspecto, la composición acuosa del paso a) comprende al menos 1%, tal como al menos 2%, al menos 3%, al menos 4% o al menos 5% de albúmina de suero de materia seca total.

[0011] En otro aspecto preferido, la composición acuosa del paso a) comprende al menos 15% (p/p), tal como al menos 20% (p/p), al menos 25% (p/p), al menos 30% (p/p), al menos 35% (p/p), al menos 40% (p/p), al menos 45% (p/p), al menos 50% (p/p), al menos 55% (p/p) o al menos 60% (p/p) de beta-lactoglobulina de proteína total.

20 En otro aspecto preferido, la composición acuosa de paso a) comprende al menos 5% (p/p), tal como al menos 10% (p/p), al menos 15% (p/p) o al menos 20% (p/p) de alfa-lactoalbúmina de proteína total.

En otro aspecto, la composición acuosa de paso a) comprende al menos 1% (p/p), tal como al menos 2% (p/p), al menos 3% (p/p), al menos 4% (p/p) o al menos 5% (p/p) de albúmina de suero de proteína total.

25 [0012] Preferiblemente, la proteína de lactosuero ha sido aislada del lactosuero y la proporción entre beta-lactoglobulina y alfa-lactoalbúmina es en esencia la misma que en el lactosuero donde esta fue aislada.

[0013] En una forma de realización preferida, la proteína de lactosuero usada en el método puede ser un concentrado de proteína de lactosuero, que tiene un contenido de proteína de aproximadamente 29% a menos de sobre 90% en una base sin humedad.

30 Concentrados de proteína de lactosuero contienen un bajo nivel de grasa y colesterol, pero generalmente tienen niveles más altos de carbohidratos en forma de lactosa.

35 [0014] En otra forma de realización, la proteína de lactosuero puede ser un aislado de proteína de lactosuero.

En general, aislados de proteína de lactosuero tienen un contenido de proteína de al menos sobre 90% de proteína de lactosuero en una base sin humedad.

Estos aislados han sido procesados en general para eliminar la grasa y la lactosa.

40 [0015] La proteína de lactosuero para ser usada en el método de la invención puede ser una mezcla de concentrado de proteína de lactosuero y aislado de proteína de lactosuero.

[0016] La proteína de lactosuero puede comprender proteínas de lactosuero intactas o esta puede comprender proteínas de lactosuero parcialmente hidrolizadas.

45 [0017] En el método de la invención, el material de proteína de lactosuero se mezcla o se dispersa típicamente en el agua para formar un compuesto acuoso comprendiendo sobre 1% a sobre 20% de proteína en peso.

En una forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender sobre 1% a sobre 5% de proteína en peso.

En otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender sobre 6% a sobre 10% de proteína en peso.

50 En otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender sobre 11% a sobre 15% de proteína en peso.

En todavía otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender sobre 16% a sobre 20% de proteína en peso.

[0018] Después de que el material de proteína se dispersa en agua, el pH y la temperatura del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar para optimizar la reacción de hidrólisis, y, en particular, para asegurar que la endopeptidasa usada en la reacción de hidrólisis funciona cerca de su nivel de actividad óptimo.

El pH del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar y controlar según métodos generalmente conocidos en la técnica. El pH del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar y mantener a de sobre 5,0 a sobre 10,0.

60 En una forma de realización, el pH del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar y mantener a de sobre 6,5 a sobre 8,0.

En una forma de realización preferida, el pH del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar y mantener a sobre 7,5.

La temperatura del compuesto acuoso de proteína se ajusta y se mantiene preferiblemente a de sobre 40°C a sobre 70°C durante la reacción de hidrólisis conforme a métodos conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, la temperatura del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar y mantener a de sobre 40°C a sobre 60°C

65 durante la reacción de hidrólisis.

En general, temperaturas superiores a este intervalo pueden inactivar la endopeptidasa, mientras temperaturas inferiores o superiores a este intervalo tienden a ralentizar la actividad de la endopeptidasa.

[0019] La reacción de hidrólisis se inicia generalmente añadiendo una endopeptidasa al compuesto acuoso de material de proteína.

[0020] Endopeptidasas para ser usadas en el método de la invención dividen específicamente en el lado del carboxi-terminal de o bien un residuo de arginina o un residuo de lisina.

Por "dividir específicamente" se entiende que la endopeptidasa tiene una especificidad más alta para la división en el lado carboxi-terminal de o bien arginina o lisina que para la división en el lado carboxi-terminal de cualquier otro aminoácido.

En una forma de realización, la endopeptidasa específicamente divide en el lado carboxi-terminal de arginina, significando que la endopeptidasa tiene una especificidad más alta para la división en el lado carboxi-terminal de arginina que para la división en el lado carboxi-terminal de cualquier otro aminoácido.

[0021] Típicamente, la endopeptidasa tiene actividad proteolítica óptima a un pH de sobre 6,0 a sobre 11,0, preferiblemente a un pH de sobre 8 a sobre 10, y a una temperatura de sobre 40°C a sobre 70°C, preferiblemente a una temperatura de sobre 45°C a sobre 60°C o de sobre 45°C a sobre 55°C.

[0022] Una endopeptidasa para ser usada en el método de la invención es de origen microbiano.

El uso de enzimas microbianas, mejor que enzimas animales o vegetales, es ventajoso en que las enzimas microbianas muestran un amplio espectro de características (pH óptimo, temperatura, etc.) y puede obtenerse consistentemente en cantidades relativamente grandes.

[0023] La endopeptidasa es preferiblemente una endopeptidasa de tipo tripsina de origen microbiano.

En el contexto de la presente invención, una endopeptidasa de tipo tripsina es una endopeptidasa con una especificidad similar al de la tripsina, por ejemplo, una endopeptidasa con una proporción de tripsina superior a 100, donde la proporción de tripsina se determina como la actividad de la enzima cuando la división después de Arg o Lys (el que sea el más grande) dividida por la actividad de la enzima cuando división después de cualquier otro aminoácido.

Estas mediciones de actividad para determinar la proporción de tripsina deberían realizarse a un valor de pH en el que la actividad de la endopeptidasa es al menos la mitad de la actividad de la endopeptidasa en su pH óptimo.

La proporción de tripsina se puede determinar como se describe en el ejemplo 3 de la presente solicitud.

[0024] En una forma de realización, la endopeptidasa es una endopeptidasa bacteriana.

[0025] En otra forma de realización, la endopeptidasa es una endopeptidasa fúngica.

En una forma de realización preferida, la endopeptidasa es de una cepa de *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium oxysporum*, por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos mostrada como en SEC ID n°: 2 de la presente solicitud (SWISSPROT n°: P35049).

Una endopeptidasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* con la secuencia de aminoácidos mostrada como aminoácidos 25-248 de SEC ID n°: 2 se ha descrito previamente (US5,288,627; US5,693,520).

[0026] En una forma de realización, la endopeptidasa es una endopeptidasa de tipo tripsina de *Achromobacter lyticus*, por ejemplo, con la secuencia de aminoácidos mostrada como en SEC ID n°: 4 de la presente solicitud (UNIPROT:P15636).

En otra forma de realización, la endopeptidasa es una endopeptidasa de tipo tripsina de *Fusarium solani*, por ejemplo, AP977S con la secuencia de aminoácidos mostrada como en la SEC ID n°: 6 de la presente solicitud (GENESEQP: ADZ80577).

En otra forma de realización, la endopeptidasa es una endopeptidasa de tipo tripsina de *Fusarium cf. solani*, por ejemplo, AP971 con la secuencia de aminoácidos mostrada como en la SEC ID n°: 8 de la presente solicitud.

[0027] En una forma de realización de la invención, la endopeptidasa se selecciona del grupo consistente en:

i) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntico a (A) cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6 o 8, o (B) un fragmento de cualquiera de estas secuencias con actividad de proteasa;

ii) un polipéptido que se codifica por un polinucleótido que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntico a cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5 o 7;

iii) un polipéptido que se codifica por un polinucleótido cuyo complemento hibridiza bajo al menos condiciones de astringencia bajas, preferiblemente al menos astringencia media, al menos astringencia alta o al menos condiciones de astringencia muy altas, con cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5 o 7; y

iv) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos modificado por sustitución, delección y/o inserción de uno o diferentes aminoácidos en (A) cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6 o 8, o (B) un fragmento de cualquiera de estas secuencias con actividad de proteasa.

[0028] Un fragmento de secuencias de un aminoácido con actividad de proteasa puede ser la secuencia de aminoácidos de la enzima activa, por ejemplo, después de tratamiento, como después de cualquier péptido señal y/o propéptido ha sido dividido.

5 Fragmentos preferidos son aminoácidos 25-248 de SEC ID n°: 2, aminoácidos 21-653 de SEC ID n°: 4, aminoácidos 26-251 de SEC ID n°: 6, o aminoácidos 18-250 de SEC ID n°: 8.

[0029] En una forma de realización preferida de la invención, la endopeptidasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% idéntico a aminoácidos 25-248 de SEC ID n°: 2.

10

[0030] Condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas se definen como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 microg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y cortado, y bien 25% formamida para astringencias bajas y muy bajas, 35% formamida para astringencias medias y medias-altas, o 50% formamida para astringencias altas y muy altas, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

15

El material portador es finalmente lavado tres veces cada una durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y de forma más preferida al menos a 70°C (astringencia muy alta).

20

En una forma de realización particular, el lavado se lleva a cabo usando 0.2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y de forma más preferida al menos a 70°C (astringencia muy alta).

25

En otra forma de realización particular, el lavado se lleva a cabo usando 0,1X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y de forma más preferida al menos a 70°C (astringencia muy alta).

30

[0031] Para fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado usando el programa Needle del paquete EMBOSS (Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000)) MBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16, (6) pp276-277 ; <http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.

35

La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización de abertura del espacio es de 10 y la penalización de extensión del espacio es de 0,5.

[0032] El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se calcula como el número de correspondencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, divididos por la longitud de la más corta de las dos secuencias.

40

El resultado se expresa en un porcentaje de identidad.

Una correspondencia exacta ocurre cuando las dos secuencias tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento.

La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (p. ej. la longitud de SEC ID n°: 2 es de 248 aminoácidos).

45

[0033] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina por el método Wilbur-Lipman (Wilbur and Lipman, 1983, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 80: 726-730) usando el software de LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) con una tabla de identidad y los siguientes parámetros de alineamiento múltiples: penalización del espacio de 10 y penalización de longitud del espacio de 10.

50

Parámetros de alineamiento de pareja son Ktuple=3, penalización espacio=3, y windows=20.

[0034] El grado de identidad entre secuencias de nucleótidos se calcula como el número de correspondencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, divididos por la longitud de la más corta de las dos secuencias.

55

El resultado se expresa en porcentaje de identidad. Una correspondencia exacta ocurre cuando las dos secuencias tienen nucleótidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento.

La longitud de una secuencia es el número de nucleótidos en la secuencia (p. ej. la longitud de SEC ID n°: 1 es de 744 nucleótidos).

[0035] Preferiblemente, la cantidad de endopeptidasa microbiana usada en el método de la invención es de sobre 0,01 a sobre 500 AU (como definido debajo) por kg de proteína de lactosuero, preferiblemente de sobre 0,1 a sobre 100 AU por kg de proteína de lactosuero, más preferiblemente de sobre 0,5 a sobre 50 AU por kg de proteína de lactosuero.

60

[0036] Una unidad de Anson (AU) se define como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (es decir, 25°C, pH 7,5 y 10 min. de tiempo de reacción) digiere la hemoglobina a un nivel inicial de manera que haya liberada por minuto una cantidad de producto soluble ATC que da el mismo color con reactivo de fenol como un miliequivalente de tirosina.

65

[0037] La cantidad de endopeptidasa añadida al material de proteína puede y variará dependiendo de la fuente del material de proteína, el grado deseado de hidrólisis y la duración de la reacción de hidrólisis.
 La cantidad de endopeptidasa puede variar de sobre 1 mg de proteína enzimática a sobre 5000 mg de proteína enzimática por kilogramo de material de proteína.
 5 En otra forma de realización, la cantidad puede variar de 10 mg de proteína enzimática a sobre 2000 mg de proteína enzimática por kilogramo de material de proteína.
 En otra forma de realización, la cantidad puede variar de sobre 50 mg de proteína enzimática a sobre 1000 mg de proteína enzimática por kilogramo de material de proteína.

[0038] Como se apreciará por un experto en la materia, la duración de la reacción de hidrólisis puede y variará.
 En términos generales, la duración de la reacción de hidrólisis puede variar de unos minutos a muchas horas, tal como, de sobre 30 minutos a sobre 48 horas.

[0039] Preferiblemente, el tratamiento con endopeptidasa microbiana produce un hidrolizado proteico de lactosuero con un grado de hidrólisis (DH) de sobre 0,1% a sobre 20%, más preferiblemente de sobre 0,5% a sobre 10% o de sobre 0,5% a sobre 8%, incluso más preferiblemente de sobre 1% a sobre 5%.

[0040] El grado de hidrólisis (DH) expresa la extensión de la hidrólisis de proteína obtenida por el método.
 20 En el contexto de la invención, el grado de hidrólisis (DH) se define de la siguiente manera:

$$DH = (\text{Número de enlaces peptídicos divididos} / \text{Número de enlaces peptídicos total}) \times 100 \%$$

El experto en la materia sabrá medir el DH.

[0041] En el paso c) del método de la invención, la endopeptidasa es inactivada.
 Esta inactivación se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, calentando por lo menos a 70°C, tal como por lo menos a 75°C o al menos a 80°C.

[0042] Un hidrolizado proteico de lactosuero obtenido por el método de la invención se puede utilizar en un producto alimenticio, por ejemplo, en una bebida.
 Ejemplos no limitativos de estos productos alimenticios incluyen bebidas deportivas o bebidas energéticas.
 Un hidrolizado proteico de lactosuero obtenido por el método de la invención puede también usarse en nutrición clínica, por ejemplo, en hospitales.

Ejemplo 1

[0043] Cinco enzimas proteolíticas diferentes se usaron para hidrolizar concentrado de proteína de lactosuero (Lacprodan 80) de Arla Foods, Dinamarca (comprendiendo sobre un 80% de proteína de materia seca total).
 40 Las enzimas y dosis fueron:

Proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, dosis de 500 mg enzimático proteína/kg materia prima.

45 PTN 6,0 (Novozymes A/S), dosis de 0,5% de materia prima.

Alcalase 2,4L (Novozymes A/S), dosis de 0,2% de materia prima.

Neutrassa 0,8L (Novozymes A/S), dosis de 1% de materia prima.

50 Protamex 1,5MG (Novozymes A/S), dosis de 0,5% de materia prima.

[0044] Concentrado de proteína de lactosuero se mezcló con agua (1:9) antes de la adición de enzima.

55 [0045] La hidrólisis se produjo a 50°C en un vaso de precipitado montado con adición de base (0,1 N de NaOH) sistema de dosificación para mantener un pH constante a pH 7,5 hasta grado de hidrólisis (DH) = 4%.

[0046] Las muestras se calentaron a 85°C para inactivar las enzimas y se evaluaron en el panel sensorial.

60 [0047] Pruebas de triángulo se usaron para comparar el hidrolizado obtenido con la proteasa microbiana de tipo tripsina con cada uno de los hidrolizados obtenidos con las otras cuatro enzimas.
 De seis panelistas cada uno recibió tres muestras codificadas.
 Se les dijo que dos de las muestras eran iguales y que una era diferente.
 Se les pidió a los panelistas que identificaran la muestra diferente.

El número de "respuestas correctas" en la tabla de debajo indica el número de panelistas que fue capaz de identificar la muestra diferente.

También se les pidió a los panelistas que seleccionaran la menos amarga de las muestras en cada prueba de triángulo.

5 [0048] Las muestras hechas con Alcalase, Neutrasa y Protamex todos tuvieron una tendencia clara a gel durante la pasteurización.

Las muestras hechas con PTN y proteasa microbiana de tipo tripsina permanecieron homogéneas.

10 [0049] Las muestras se diluyeron en contenido de proteína 3% antes de la evaluación de sabor.

[0050] Los resultados de las evaluaciones de sabor de triángulo se muestran debajo.

MTP es la proteasa microbiana experimental de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

Seis panelistas se incluyeron en la evaluación.

15 Si al menos 5 respuestas correctas fueron dadas (columna 2), la diferencia entre las muestras fue considerada significativa.

Las columnas tercera y cuarta son el número de panelistas (con respuestas correctas en la segunda columna) que encontraron que cualquiera de las muestras tienen un sabor menos amargo:

	Respuestas correctas	Menos amargo	
		PTN	MTP
Ensayo 1, PTN	5	PTN	MTP
		2	3
Ensayo 2, Alcalase	4	Alcalase	MTP
			2
Ensayo 3, Neutrase	2	Neutrase	MTP
		1	
Ensayo 4, Protamex	3	Protamex	MTP
		2	1

20 [0051] Los resultados muestran que hay una diferencia significativa entre las muestras producidas MTP y PTN donde las muestras producidas MTP se seleccionan como que eran menos amargas que las muestras producidas PTN.

Ninguna diferencia significativa se mostró entre las muestras producidas MTP y cualquiera de las muestras producidas con las enzimas que no tenían especificidad Lys y Arg (Alcalase, Neutrasa, Protamex).

25 **Ejemplo 2**

[0052] Cinco enzimas proteolíticas diferentes se usaron para hidrolizar concentrado de proteína de lactosuero de Leprino Foods, EEUU (comprendiendo sobre 80% de proteína de materia seca total).

30 Las enzimas y dosis fueron:

Proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, dosis de 500 mg de enzima proteína/kg materia prima.

35 PTN 6,0 (Novozymes A/S), dosis de 0,5% de materia prima.

Alcalase 2,4L (Novozymes A/S), dosis de 0,2% de materia prima.

Neutrasa 0,8L (Novozymes A/S), dosis de 1% de materia prima.

40 Protamex 1,5MG (Novozymes A/S), dosis de 0,5% de materia prima.

[0053] Concentrado de proteína de lactosuero se mezcló con agua (1:9) antes de adición de enzima.

45 [0054] Hidrólisis se produjo a 50°C en un vaso de precipitado montado con adición de base (0,1N de NaOH) sistema de dosificación para mantener un pH constante a pH 7,5 hasta grado de hidrólisis (DH) = 4%.

[0055] Las muestras se calentaron a 85°C para inactivar las enzimas y se evaluaron en el panel sensorial.

[0056] Pruebas de triángulo se usaron para comparar el hidrolizado obtenido con la proteasa microbiana de tipo tripsina con cada uno de los hidrolizados obtenidos con las otras cuatro enzimas.

De siete panelistas cada uno recibió tres muestras codificadas.

Se les dijo que dos de las muestras eran iguales y que una era diferente.

5 Se le pidió a los panelistas que identificaran la muestra diferente.

El número de "respuestas correctas" en la tabla de debajo indica el número de panelistas que fue capaz de identificar la muestra diferente.

También se le pidió a los panelistas que seleccionaran la menos amarga de las muestras en cada prueba de triángulo.

10 [0057] Todas las muestras permanecieron homogéneas durante/después de la pasteurización.

[0058] Las muestras se diluyeron a contenido de proteína 3% antes de la evaluación de sabor.

[0059] Resultados de las evaluaciones de sabor de triángulo se muestran debajo.

15 MTP es la proteasa experimental microbiana de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

Siete panelistas se incluyeron en la evaluación.

Si al menos 5 respuestas correctas fueron dadas (columna 2), la diferencia entre las muestras se consideró significativa.

Las columnas tercera y cuarta son el número de panelistas (con respuestas correctas en la segunda columna) que encontraron que cualquiera de las muestras tienen un sabor menos amargo:

20

	Respuestas correctas	Menos amargo	
		PTN	MTP
Ensayo 1, PTN	5	PTN	MTP
			4
Ensayo 2, Alcalase	6	Alcalase	MTP
			4
Ensayo 3, Neutrased	2	Neutrased	MTP
			2
Ensayo 4, Protamex	3	Protamex	MTP
		3	

[0060] Los resultados muestran que hay una diferencia significativa entre las muestras producidas con MTP y las muestras producidas con cualquiera de Alcalase o PTN donde las muestras producidas MTP se seleccionaron como que eran menos amargas que ambas muestras producidas de Alcalase y PTN.

25

Ejemplo 3

Definición, medición y cálculo de la proporción de tripsina

30

Principio

[0061] Para hacer un ensayo que se pueda medir para la determinación de la actividad de endopeptidasa de tipo tripsina, hemos usado 10 sustratos cromogénicos diferentes con la fórmula general Suc-AAPX-pNA - donde X es la primera letra de abreviatura para uno de los veinte residuos naturales de aminoácidos.

35

La endopeptidasa se dividirá en el lado del carboxi-terminal de X y liberará un color amarillo (para-nitroanilina), que puede medirse.

Hemos usado estos 10 sustratos Suc-AAPX-pNA diferentes disponibles de Bachem (X = A, R, D, E, I, L, K, M, F y V) para hacer la medición y el cálculo de lo que llamamos la proporción de tripsina.

40

Una endopeptidasa de tipo tripsina en el contexto de la presente invención puede definirse como una endopeptidasa con una proporción de tripsina superior a 100.

[0062] La proporción de tripsina se calcula como la actividad máxima en o bien Suc-AAPR-pNA o Suc-AAPK-pNA dividida por la actividad máxima en cualquiera de los otros ocho sustratos Suc-AAPX-pNA:

45

Proporción tripsina = actividad máx en Suc-AAP(R/K)-pNA / actividad máx en Suc-AAP(nonR/K)-pNA

[0063] Las mediciones de actividad deberían realizarse a un valor de pH en el que la actividad es al menos la mitad de la actividad a pH óptimo.

Materiales y métodos

5

Ensayo Suc-AAPX-pNA:

[0064]

- 10 Sustratos: Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)
 Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)
 Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)
 Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)
 15 Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)
 Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)
 Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)
 Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)
 Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)
 Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)

20 Temperatura: temperatura ambiente (25°C)

Tampón de ensayo: 100mM de ácido succínico, 100mM de HEPES, 100mM de CHES, 100mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100, pH 9,0.

Ensayo: 20 ul (microlitro) de dilución de peptidasa (diluida en 0,01% de Tritón X-100) se colocó en un pocillo en una placa de microtitulación.

25 El ensayo se comenzó añadiendo 200 ul de sustrato de pNA (50 mg disuelto en 1,0 ml de DMSO y además diluido 90x con el tampón de ensayo).

El aumento inicial en OD₄₀₅ se controló como una medida de la actividad de peptidasa.

Si un gráfico lineal (o cerca de lineal) no se consiguió en los 4 minutos de tiempo de medición, la peptidasa se diluyó además y el ensayo se repitió.

- 30 Peptidasas: Alcalase (Novozymes A/S, Dinamarca)
 Achromobacter lyticus lisil-endopeptidasa (SEC ID n°: 4)
 Proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*
 Tripsina porcina (Novozymes A/S, Dinamarca)

Todas las enzimas fueron purificadas por cromatografía a una alta pureza.

35 Sólo una banda se vio para cada peptidasa en los geles de SDS-PAGE coomassie manchados.

Características para peptidasas:

Alcalase: pH_{opt} = pH 9 en Suc-AAPF-pNA.

Proteasa de *Achromobacter lyticus*: pH_{opt} = pH 10 en Suc-AAPK-pNA.

Proteasa de tipo tripsina de *Fusarium*: pH_{opt} = pH 10 en Boc-VLGR-pNA.

40 Tripsina porcina: pH_{opt} = pH 10 en Boc-VLGR-pNA.

Resultados

[0065] Especificidad de peptidasas en sustratos Suc-AAPX-pNA a pH 9 y cálculo de la proporción de tripsina:

45

[0066] El experimento de especificidad se realizó a pH 9.

Como se puede observar en el párrafo de materiales y métodos, tres de las peptidasas evaluadas tienen pH_{opt} > pH 9.

No obstante, para estas tres peptidasas la actividad a pH 9 es más de la mitad de la actividad a pH_{opt}.

Los resultados se muestran en la tabla de debajo:

50

Suc-AAPX-pNA	Alcalase	Proteasa de <i>Achromobacter lyticus</i>	Tripsina de <i>Fusarium</i>	Tripsina porcina
Suc-AAPA-pNA	0,02497	- 0,00001	0,00000	0,00001
Suc-AAPR-pNA	0,01182	0,00001	1,00000	1,00000
Suc-AAPD-pNA	0,00053	0,00000	0,00000	0,00000
Suc-AAPI-pNA	0,00026	0,00000	0,00000	0,00000
Suc-AAPM-pNA	0,37582	0,00023	0,00002	0,00031
Suc-AAPV-pNA	0,00033	0,00000	0,00000	0,00000
Suc-AAPL-pNA	0,86502	0,00001	0,00000	0,00002
Suc-AAPE-pNA	0,00289	0,00000	0,00000	0,00000

ES 2 374 854 T3

Suc-AAPK-pNA	0,01900	1,00000	0,53071	0,51396
Suc-AAPF-pNA	1,00000	0,00001	0,00003	0,00057
Máx de Suc-AAP(R/K)-pNA	0,01900	1,00000	1,00000	1,00000
Máx de Suc-AAP(nonR/K)-pNA	1,00000	0,00023	0,00003	0,00057
Proporción tripsina	0,019	4300	33000	1750

[0067] Los datos de actividad proporcionados para cada endopeptidasa en la tabla es relativa a la actividad con el mejor sustrato Suc-AAPX-pNA.

5 [0068] Se puede observar que según nuestra definición, la proteasa de *Achromobacter lyticus*, la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium* y tripsina porcina son endopeptidasas de tipo tripsina. Mientras que Alcalase no es una endopeptidasa de tipo tripsina.

Listado de secuencias

10

[0069]

<110> Novozymes A/S

15

<120> hidrolizado proteico de lactosuero

<130> 11267

20

<160> 8

<170> Versión de patentIn 3.5

25

<210> 1

<211> 744

<212> ADN

<213> *Fusarium oxysporum*

<400> 1

```

atgggtcaagt tcgcttccgt cgttgcactt gttgctcccc tggctgctgc cgctcctcag      60
gagatcccca acattgttgg tggcacttct gccagcgctg gcgactttcc cttcatcgtg      120
agcattagcc gcaacggtgg cccctggtgt ggaggttctc tcctcaacgc caacaccgtc      180
ttgactgctg cccactgcgt ttccggatac gtcagagcg gtttccagat tcgtgctggc      240
agtctgtctc gcacttctgg tggattacc tcctcgcttt cctccgctcag agttcacctt      300
agctacagcg gaaacaaca cgatcttgct attctgaagc tctctacttc catcccctcc      360
ggcggaaaca tcggctatgc tcgcctggct gcttccggct ctgaccctgt cgctggatct      420
tctgccactg ttgctggctg gggcgctacc tctgagggcg gcagctctac tcccgtcaac      480
cttctgaagg ttactgtccc tatcgtctct cgtgctacct gccgagctca gtacggcacc      540
tccgccatca ccaaccagat gttctgtgct ggtgtttctt ccggtggcaa ggactcttgc      600
cagggtgaca gcggcggccc catcgtcgac agctccaaca ctcttatcgg tgctgtctct      660
tggggtaacg gatgtgcccg acccaactac tctggtgtct atgccagcgt tgggtgctctc      720
cgctctttca ttgacaccta tgct                                     744

```

30

<210> 2

<211> 248

<212> PRT

ES 2 374 854 T3

<213> Fusarium oxysporum

<400> 2

Met Val Lys Phe Ala Ser Val Val Ala Leu Val Ala Pro Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Gln Glu Ile Pro Asn Ile Val Gly Gly Thr Ser Ala Ser
 20 25 30
 Ala Gly Asp Phe Pro Phe Ile Val Ser Ile Ser Arg Asn Gly Gly Pro
 35 40 45
 Trp Cys Gly Gly Ser Leu Leu Asn Ala Asn Thr Val Leu Thr Ala Ala
 50 55 60
 5 His Cys Val Ser Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Phe Gln Ile Arg Ala Gly
 65 70 75 80
 Ser Leu Ser Arg Thr Ser Gly Gly Ile Thr Ser Ser Leu Ser Ser Val
 85 90 95
 Arg Val His Pro Ser Tyr Ser Gly Asn Asn Asn Asp Leu Ala Ile Leu
 100 105 110
 Lys Leu Ser Thr Ser Ile Pro Ser Gly Gly Asn Ile Gly Tyr Ala Arg
 115 120 125
 Leu Ala Ala Ser Gly Ser Asp Pro Val Ala Gly Ser Ser Ala Thr Val
 130 135 140
 Ala Gly Trp Gly Ala Thr Ser Glu Gly Gly Ser Ser Thr Pro Val Asn
 145 150 155 160
 Leu Leu Lys Val Thr Val Pro Ile Val Ser Arg Ala Thr Cys Arg Ala
 165 170 175
 Gln Tyr Gly Thr Ser Ala Ile Thr Asn Gln Met Phe Cys Ala Gly Val
 180 185 190
 Ser Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Ile
 195 200 205
 Val Asp Ser Ser Asn Thr Leu Ile Gly Ala Val Ser Trp Gly Asn Gly
 210 215 220
 Cys Ala Arg Pro Asn Tyr Ser Gly Val Tyr Ala Ser Val Gly Ala Leu
 225 230 235 240
 Arg Ser Phe Ile Asp Thr Tyr Ala
 245

ES 2 374 854 T3

<210> 3

<211> 1959

<212> ADN

5 <213> Achromobacter lyticus

<400> 3

```
atgaaacgca tttgtggttc cctgctgttg ctcggtttgt cgatcagcgc cgcgctcgcc      60
gccccggcct cgcgccccgc ggcgttcgat tacgccaatc tttccagcgt cgacaaggtc      120
gccttgcgca ccatgccggc ggtcgacgtg gccaaggcca aggccgaaga tttgcagcgc      180
gacaagcgcg gcgacatccc gcgcttcgcc ctggcgatcg acgtggacat gaccctcag      240
aattccggcg cgtgggaata caccgccgac ggccagttcg ccgtatggcg ccagcgcggt      300
cgttcggaga aggcgctgtc actgaacttc ggtttcaccg actactacat gcccgccggc      360
ggccgcctgc tggatatcc ggcgactcag gcgccggccg gcgatcgcgg cttgatcagc      420
cagtacgacg ccagcaaaa caactcggcg cgccaactgt ggacggcggt ggtgccgggc      480
```

ES 2 374 854 T3

gccgaagcgg tgatcgaagc ggtgatcccg cgcgacaagg tcggcgagtt caagctgcgc 540
 ctgaccaagg tcaaccacga ctacgtcggg ttcggcccgc tcgcgcgccg cctggccgct 600
 gcgtccggcg agaagggcgt gtcgggttcg tgcaacatcg acgtggtctg ccccgaaggc 660
 gacggccgcc gcgacatcat ccgcgcggtc ggtgctact cgaagagcgg cacgctggcc 720
 tgtaccgggt cgctggtcaa caacaccgcc aacgaccgca agatgtactt cctgaccgcg 780
 caccactgcg gcatgggcac ggcctcgacc gccgcgtcga tcgtggtgta ctggaactat 840
 cagaactcga cctgccgcgc gcccaacacg ccggccagcg gcgccaacgg cgacggctcg 900
 atgagccaga cccagtcggg ttcgacggtc aaggcgacct acgccacctc cgacttcacc 960
 ctgctcgagt tgaacaatgc ggccaacccc gcgttcaacc tgttctgggc cggttgggac 1020
 cgctcgaccc agaactatcc cggcgcgatc gccatccacc atcccaacgt cgccgagaag 1080
 cgcatcagca actccaccag cccgacctcg ttcgtggcct ggggcgggcg cgccggcacc 1140
 acgcatctga acgtgcagtg gcagccctcg ggcggcgtga ccgagccggg ttcgtcgggt 1200
 tcgccgatct acagcccgga aaagcgcgtg ctcggccagc tgcacggcg cgccgtcagc 1260
 tgcagcgcca ccggcaccaa ccgacgcgac cagtacggcc gcgtgttcac ctcgtggacc 1320
 ggcggcggcg ccgcccctc gcgcctgagc gattggctcg atccggccag caccggcgcg 1380
 cagttcatcg acggcctgga ttcgggcccg ggcagcccga aactccgcc ggtggcgaac 1440
 ttcacctcca ccaccagcgg cctgaccgcg accttcaccg acagctccac cgacagcgac 1500
 ggttcgatcg cctcgcgtag ctggaacttc ggcagcggca gcacctcgac cgcgaccaac 1560
 ccgagcaaga cctacgccgc ggcgggcacc tacaccgtca ccctgacggg caccgacaac 1620
 ggcggcgcca ccaacaccaa gaccggttcg gtcaccgtgt ccggcgggcc ggtgctcag 1680
 acctacacca acgacaccga tgtggcgtc ccggacaacg cgacggtcga aagcccgatc 1740
 accgtgtccg gccgcaccgg caacggctcg gcgaccacgc cgatccaggt gacgatctac 1800
 cacacctaca agagcgatct gaaggtggac ctggctcgcg cggacggcac cgtctacaac 1860
 ctgcacaacc gcaccggcgg cagcgcgcac aacatcatcc agaccttcac caaggacctg 1920
 tcgagcgaag cggctcaacg ggcacctgga agctgcggg 1959

<210> 4
 <211> 653
 <212> PRT
 <213> Achromobacter lyticus

<400> 4

Met Lys Arg Ile Cys Gly Ser Leu Leu Leu Leu Gly Leu Ser Ile Ser
 1 5 10 15
 Ala Ala Leu Ala Ala Pro Ala Ser Arg Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Ala
 20 25 30
 Asn Leu Ser Ser Val Asp Lys Val Ala Leu Arg Thr Met Pro Ala Val
 35 40 45

ES 2 374 854 T3

Asp Val Ala Lys Ala Lys Ala Glu Asp Leu Gln Arg Asp Lys Arg Gly
 50 55 60

Asp Ile Pro Arg Phe Ala Leu Ala Ile Asp Val Asp Met Thr Pro Gln
 65 70 75 80

Asn Ser Gly Ala Trp Glu Tyr Thr Ala Asp Gly Gln Phe Ala Val Trp
 85 90 95

Arg Gln Arg Val Arg Ser Glu Lys Ala Leu Ser Leu Asn Phe Gly Phe
 100 105 110

Thr Asp Tyr Tyr Met Pro Ala Gly Gly Arg Leu Leu Val Tyr Pro Ala
 115 120 125

Thr Gln Ala Pro Ala Gly Asp Arg Gly Leu Ile Ser Gln Tyr Asp Ala
 130 135 140

Ser Asn Asn Asn Ser Ala Arg Gln Leu Trp Thr Ala Val Val Pro Gly
 145 150 155 160

Ala Glu Ala Val Ile Glu Ala Val Ile Pro Arg Asp Lys Val Gly Glu
 165 170 175

Phe Lys Leu Arg Leu Thr Lys Val Asn His Asp Tyr Val Gly Phe Gly
 180 185 190

Pro Leu Ala Arg Arg Leu Ala Ala Ala Ser Gly Glu Lys Gly Val Ser
 195 200 205

Gly Ser Cys Asn Ile Asp Val Val Cys Pro Glu Gly Asp Gly Arg Arg
 210 215 220

Asp Ile Ile Arg Ala Val Gly Ala Tyr Ser Lys Ser Gly Thr Leu Ala
 225 230 235 240

Cys Thr Gly Ser Leu Val Asn Asn Thr Ala Asn Asp Arg Lys Met Tyr
 245 250 255

Phe Leu Thr Ala His His Cys Gly Met Gly Thr Ala Ser Thr Ala Ala
 260 265 270

Ser Ile Val Val Tyr Trp Asn Tyr Gln Asn Ser Thr Cys Arg Ala Pro
 275 280 285

Asn Thr Pro Ala Ser Gly Ala Asn Gly Asp Gly Ser Met Ser Gln Thr
 290 295 300

Gln Ser Gly Ser Thr Val Lys Ala Thr Tyr Ala Thr Ser Asp Phe Thr
 305 310 315 320

ES 2 374 854 T3

Leu Leu Glu Leu Asn Asn Ala Ala Asn Pro Ala Phe Asn Leu Phe Trp
 325 330 335
 Ala Gly Trp Asp Arg Arg Asp Gln Asn Tyr Pro Gly Ala Ile Ala Ile
 340 345 350
 His His Pro Asn Val Ala Glu Lys Arg Ile Ser Asn Ser Thr Ser Pro
 355 360 365
 Thr Ser Phe Val Ala Trp Gly Gly Gly Ala Gly Thr Thr His Leu Asn
 370 375
 Val Gln Trp Gln Pro Ser Gly Gly Val Thr Glu Pro Gly Ser Ser Gly
 385 390 395 400
 Ser Pro Ile Tyr Ser Pro Glu Lys Arg Val Leu Gly Gln Leu His Gly
 405 410 415
 Gly Pro Ser Ser Cys Ser Ala Thr Gly Thr Asn Arg Ser Asp Gln Tyr
 420 425 430
 Gly Arg Val Phe Thr Ser Trp Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Ser Arg
 435 440 445
 Leu Ser Asp Trp Leu Asp Pro Ala Ser Thr Gly Ala Gln Phe Ile Asp
 450 455 460
 Gly Leu Asp Ser Gly Gly Gly Thr Pro Asn Thr Pro Pro Val Ala Asn
 465 470 475 480
 Phe Thr Ser Thr Thr Ser Gly Leu Thr Ala Thr Phe Thr Asp Ser Ser
 485 490 495
 Thr Asp Ser Asp Gly Ser Ile Ala Ser Arg Ser Trp Asn Phe Gly Asp
 500 505 510
 Gly Ser Thr Ser Thr Ala Thr Asn Pro Ser Lys Thr Tyr Ala Ala Ala
 515 520 525
 Gly Thr Tyr Thr Val Thr Leu Thr Val Thr Asp Asn Gly Gly Ala Thr
 530 535 540
 Asn Thr Lys Thr Gly Ser Val Thr Val Ser Gly Gly Pro Gly Ala Gln
 545 550 555 560
 Thr Tyr Thr Asn Asp Thr Asp Val Ala Ile Pro Asp Asn Ala Thr Val
 565 570 575
 Glu Ser Pro Ile Thr Val Ser Gly Arg Thr Gly Asn Gly Ser Ala Thr
 580 585 590
 Thr Pro Ile Gln Val Thr Ile Tyr His Thr Tyr Lys Ser Asp Leu Lys

ES 2 374 854 T3

Met Val Lys Phe Ala Ala Ile Leu Ala Leu Val Ala Pro Leu Val Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Pro Gln Asp Ser Ser Pro Met Ile Val Gly Gly Thr Ala Ala
 20 25 30

Ser Ala Gly Asp Phe Pro Phe Ile Val Ser Ile Ala Tyr Asn Gly Gly
 35 40 45

Pro Trp Cys Gly Gly Thr Leu Leu Asn Ala Asn Thr Val Met Thr Ala
 50 55 60

Ala His Cys Thr Gln Gly Arg Ser Ala Ser Ala Phe Gln Val Arg Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Leu Asn Arg Asn Ser Gly Gly Val Thr Ser Ser Val Ser Ser
 85 90 95

Ile Arg Ile His Pro Ser Phe Ser Ser Ser Thr Leu Asn Asn Asp Val
 100 105 110

Ser Ile Leu Lys Leu Ser Thr Pro Ile Ser Thr Ser Ser Thr Ile Ser
 115 120 125

Tyr Gly Arg Leu Ala Ala Ser Gly Ser Asp Pro Val Ala Gly Ser Asp
 130 135 140

Ala Thr Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Ser Gln Gly Ser Ser Ser Ser
 145 150 155 160

Pro Val Ala Leu Arg Lys Val Thr Ile Pro Ile Val Ser Arg Thr Thr
 165 170 175

Cys Arg Ser Gln Tyr Gly Thr Ser Ala Ile Thr Thr Asn Met Phe Cys
 180 185 190

Ala Gly Leu Ala Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
 195 200 205

Gly Pro Ile Val Asp Thr Ser Asn Thr Val Ile Gly Ile Val Ser Trp
 210 215 220

Gly Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Leu Ser Gly Val Tyr Ala Arg Val
 225 230 235 240

Gly Ser Leu Arg Thr Tyr Ile Asp Gly Gln Leu
 245 250

<210> 7
 <211> 750
 <212> ADN
 <213> Fusarium cf. solani

5

<400> 7

ES 2 374 854 T3

atggtcaagt ttgctgccat cctcgcactt gttgcgctc ttgtcgccgc tcggcctcag	60
gaccgacca tgattgtcgg cggaactgct gccagcgcag gtgacttccc cttcatcgtc	120
agcatcgcct acaatggtgg cccttggtgc ggaggtaccc tcctcaacgc cagcaccgtc	180
ttgactgctg cccactgcac ccaaggtcgc tctgctagcg cttccaggt ccgcgctgga	240
agcttgaacc gcaactcggg tggtgttacc tctgccgttt cttccatccg gatccatcct	300
agcttcagtg gctcgaccct gaacaacgat gtttctatcc tgaagctgtc ccccccatc	360
tcgactagct ccaccatctc ttatggtcgc ttggctgcgt cgggctccga ccctgctgcc	420
ggctctgatg ccacagttgc tggctggggt gtcacttctc agggctcttc cagctcccc	480
gtcgcctttga ggaaggttac cattcccatt gtctctcgca ccacttgccg atcccagtat	540
ggcacttctg ccatcaccac caacatgttc tgcgctggcc ttgctgaggg tggaaaggac	600
tcttgccagg gcgacagcgg tggtcccatt gtcgacacct ccaacactgt cattggcatt	660
gtttcttggg gtgagggttg tgctcagccc aacttctctg gtgtctatgc ccgcgttggc	720
agcctccgct cttacattga cggccagctg	750

<210> 8

<211> 250

5 <212> PRT

<213> *Fusarium cf. solani*

<400> 8

10

ES 2 374 854 T3

Met Val Lys Phe Ala Ala Ile Leu Ala Leu Val Ala Pro Leu Val Ala
1 5 10 15

Ala Arg Pro Gln Asp Arg Pro Met Ile Val Gly Gly Thr Ala Ala Ser
20 25 30

Ala Gly Asp Phe Pro Phe Ile Val Ser Ile Ala Tyr Asn Gly Gly Pro
35 40 45

Trp Cys Gly Gly Thr Leu Leu Asn Ala Ser Thr Val Leu Thr Ala Ala
50 55 60

His Cys Thr Gln Gly Arg Ser Ala Ser Ala Phe Gln Val Arg Ala Gly
65 70 75 80

Ser Leu Asn Arg Asn Ser Gly Gly Val Thr Ser Ala Val Ser Ser Ile
85 90 95

Arg Ile His Pro Ser Phe Ser Gly Ser Thr Leu Asn Asn Asp Val Ser
100 105 110

Ile Leu Lys Leu Ser Thr Pro Ile Ser Thr Ser Ser Thr Ile Ser Tyr
115 120 125

Gly Arg Leu Ala Ala Ser Gly Ser Asp Pro Ala Ala Gly Ser Asp Ala
130 135 140

Thr Val Ala Gly Trp Gly Val Thr Ser Gln Gly Ser Ser Ser Ser Pro
145 150 155 160

Val Ala Leu Arg Lys Val Thr Ile Pro Ile Val Ser Arg Thr Thr Cys
165 170 175

Arg Ser Gln Tyr Gly Thr Ser Ala Ile Thr Thr Asn Met Phe Cys Ala
180 185 190

Gly Leu Ala Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly
195 200 205

Pro Ile Val Asp Thr Ser Asn Thr Val Ile Gly Ile Val Ser Trp Gly
210 215 220

Glu Gly Cys Ala Gln Pro Asn Phe Ser Gly Val Tyr Ala Arg Val Gly
225 230 235 240

Ser Leu Arg Ser Tyr Ile Asp Gly Gln Leu
245 250

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de un hidrolizado proteico de lactosuero comprendiendo:
- 5 a) provisión de una composición acuosa de proteína de lactosuero comprendiendo beta-lactoglobulina y alfa-lactoalbúmina;
- b) sometimiento de dicha composición a la acción de una endopeptidasa microbiana que específicamente divide en el lado carboxi-terminal de arginina o lisina; e
- 10 c) inactivación de la endopeptidasa.
2. Método según la reivindicación 1, donde la endopeptidasa microbiana es una endopeptidasa fúngica.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, donde la endopeptidasa fúngica se deriva de una cepa de *Fusarium*.
4. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la endopeptidasa tiene actividad proteolítica óptima a un pH de sobre 8 a sobre 10.
- 20 5. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la endopeptidasa tiene actividad proteolítica óptima a una temperatura de sobre 45°C a sobre 60°C.
6. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la endopeptidasa se selecciona del grupo consistente en:
- 25 i) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que es al menos 60% idéntico a (A) cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6 o 8, o (B) un fragmento de cualquiera de estas secuencias con actividad de proteasa;
- 30 ii) un polipéptido que se codifica por un polinucleótido que es al menos 60% idéntico a cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5 o 7;
- iii) un polipéptido que se codifica por un polinucleótido cuyo complemento hibridiza bajo condiciones de astringencia bajas con cualquiera de SEC ID N°: 1, 3, 5 o 7 y
- 35 iv) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos modificada por sustitución, delección y/o inserción de uno o varios aminoácidos en (A) cualquiera de SEC ID N°: 2, 4, 6 o 8, o (B) un fragmento de cualquiera de estas secuencias con actividad de proteasa.
7. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la endopeptidasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 60% idéntica a aminoácidos 25-248 de SEC ID n°: 2.
- 40 8. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la proteína de lactosuero es concentrado de proteína de lactosuero o aislado de proteína de lactosuero.
- 45 9. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la solución acuosa de proteína de lactosuero comprende al menos 5% de alfa-lactoalbúmina de materia seca total.
10. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el hidrolizado proteico de lactosuero tiene un grado de hidrólisis de sobre 0,1 % a sobre 20%.
- 50 11. Método según la reivindicación 10, donde el hidrolizado proteico de lactosuero tiene un grado de hidrólisis de sobre 0,5% a sobre 8%.
12. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el paso c) comprende calentamiento por lo menos a 70°C.
- 55 13. Método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la endopeptidasa se añade a una concentración de 0,01-10 g de proteína enzimática por kg de proteína de lactosuero.
- 60 14. Hidrolizado proteico de lactosuero obtenido por el método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el uso en nutrición clínica.
15. Uso de un hidrolizado proteico de lactosuero obtenido por el método de cualquiera de reivindicaciones 1-13 en una bebida deportiva.