

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 285**

51 Int. Cl.:

A23J 1/00 (2006.01)

A23J 1/12 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09757484 .2**

96 Fecha de presentación: **29.05.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2296487**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.03.2011**

54 Título: **Método para la producción de un hidrolizado de proteína de trigo**

30 Prioridad:
03.06.2008 EP 08157452

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.04.2012

73 Titular/es:
**Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

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

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 378 285 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

Método para la producción de un hidrolizado de proteína de trigo

5 REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador. El formato legible por ordenador se incorpora aquí por referencia.

10 CAMPO TÉCNICO

[0002] La presente invención se refiere a un método para la producción de un hidrolizado de proteína de trigo utilizando una endopeptidasa microbiana.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Los hidrolizados de proteína de trigo han sido utilizados tradicionalmente como aditivos alimentarios y ahora se utilizan a nivel mundial en la cocina, por ejemplo, para dar sabor. Los hidrolizados de proteína de trigo se utilizan además para el enriquecimiento de las proteínas, por ejemplo, en bebidas para deportistas, dado que la proteína de trigo proporciona niveles de glutamina mayores que, por ejemplo, la proteína de soja, y en otras bebidas dietéticas, bebidas en polvo o barritas nutritivas, etc. Los hidrolizados de proteína de trigo pueden fabricarse usando enzimas proteolíticas para hidrolizar la proteína de trigo. En la fabricación industrial de hidrolizados de proteína de trigo es importante una solubilidad o suspendibilidad alta de la proteína hidrolizada desde ambos, el punto de vista del procesamiento, desde un punto de vista del factor económico o de eficiencia, y por una sensación en la boca y las propiedades sensoriales. Ha sido por lo tanto un objeto de los presentes inventores identificar las enzimas proteolíticas, que son útiles para la elaboración de hidrolizados de proteína de trigo con una alta solubilidad.

[0004] Las endopeptidasas que se consideran aplicables según la presente invención han sido descritas previamente. Por ejemplo, la endopeptidasa derivada de *Nocardioopsis sp.* NRRL 18262 se divulga en el documento WO88/03947 (aquí se hace referencia a la cepa como cepa *Nocardioopsis sp.* 10R) y el documento WO01/58276. Otras endopeptidasas útiles según la invención se describen en los documentos WO88/03947, WO04/111220 WO04/111222 WO04/11122 WO05/123911, y WO04/072279.

[0005] El documento WO 98/27827 divulga un proceso para obtener material proteínico enzimáticamente hidrolizado, tal como proteína de trigo, utilizando una exopeptidasa en combinación con una o más endopeptidasas adecuadas.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] Los presentes inventores han identificado endopeptidasas que se han descubierto que son aplicables en la producción de hidrolizados de proteína de trigo, con una alta solubilidad y que dan lugar a suspensiones uniformes. Estas endopeptidasas son más eficaces que otras endopeptidasas usadas en la técnica cuando se comparan con una cantidad igual de proteína enzimática, lo que se traduce en una economía de producto mejor para los productores de hidrolizados de proteína de trigo. Consecuentemente, la presente invención se refiere a un método de producción de un hidrolizado de proteína de trigo, comprendiendo: a) adición de una endopeptidasa con al menos un 50% de identidad con la SEC ID n.º:1 a una composición de proteína de trigo y b) incubación para hidrolizar la proteína de trigo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIONEndopeptidasa

[0007] El término endopeptidasa como se utiliza en este caso es una enzima que hidroliza enlaces internos de péptido (tiene actividad de endopeptidasa).

[0008] No hay limitaciones en lo que respecta al origen de la endopeptidasa para el uso según la invención. De esta manera, el término endopeptidasa incluye no sólo endopeptidasas de tipo natural o salvaje, sino también algunas mutantes, variantes, fragmentos etc., de las mismas mostrando actividad de endopeptidasa, al igual que las endopeptidasas sintéticas, como por ejemplo, las endopeptidasas redistribuidas. Las variantes de endopeptidasa modificadas genéticamente se pueden preparar de forma generalmente conocida en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis dirigida, por PCR (usando un fragmento PCR que contenga la mutación deseada como una de las cargas en las reacciones PCR), o por mutagénesis aleatoria. Ejemplos de variantes de endopeptidasa, como se usan en el presente contexto, son endopeptidasas en las cuales uno o varios aminoácidos se han eliminado, insertado o sustituido por otros aminoácidos.

[0009] Ejemplos de endopeptidasas para uso según la invención son

65

- (i) la endopeptidasa derivada de *Nocardiosis sp.* NRRL 18262, descrita en el documento WO01/58276, cuya secuencia se muestra como la SEC ID n.º: 1 del presente documento;
- (ii) endopeptidasas con al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, o al menos un 95% de identidad de aminoácido con la endopeptidasa de (i);
- (iii) mutantes, variantes o fragmentos de endopeptidasas de (i) o (ii) que muestran actividad de endopeptidasa.

[0010] Para los fines de la presente invención, podrá determinarse la alineación de dos secuencias de aminoácidos usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle ejecuta el algoritmo de alineación global descrito en Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización de abertura de espacio es 10, y la penalización de extensión de espacio es 0.5.

[0011] El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se calcula como el número de coincidencias exactas en una alineación de las dos secuencias, dividido por la longitud de la más corta de las dos secuencias. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0012] Una coincidencia exacta ocurre cuando las dos secuencias poseen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones de la coincidencia. La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos de la secuencia (p. ej. la longitud de la SEC ID n.º: 1 es 188).

[0013] Como ejemplos de endopeptidasas bacterianas aplicables para uso según la invención pueden nombrarse además la endopeptidasa de *Nocardiosis alba* (previamente *Nocardiosis dassonvillei*) NRRL 18133 divulgada en el documento WO88/03947, las endopeptidasas de *Nocardiosis dassonvillei* subesp. *dassonvillei* DSM 43235, *Nocardiosis alba* DSM 15647, *Nocardiosis sp.* DSM 16424 y la proteasa sintética 22, divulgadas las cuatro en el documento WO04/111220, la endopeptidasa de *Nocardiosis prasina* DSM 15648 divulgada en el documento WO04/111222, la endopeptidasa de *Nocardiosis prasina* DSM 15649 divulgada en el documento WO04/111223, las endopeptidasas de *Nocardiosis prasina* (antes *Nocardiosis alba*) DSM 14010, *Nocardiosis alkaliphila* DSM 44657 y *Nocardiosis lucentensis* DSM 44048, divulgadas las tres en el documento WO05/123911, las endopeptidasas de *Brachysporiella gayana* CGMCC 0865, *Metarhizium anisopliae*, *Gliocladium sp.* CBS 114001, *Periconia sp.* CBS 114002, *Periconia sp.* CBS 114000 y *Curvularia lunata* CBS 114003, las seis divulgadas en el documento WO04/072279, y mutantes, variantes o fragmentos de cualquiera de ellas que muestre actividad de endopeptidasa.

[0014] Una endopeptidasa para uso según la invención es una endopeptidasa microbiana, preferiblemente una endopeptidasa bacteriana, indicando el término bacteriano, que la endopeptidasa se deriva de o ha sido originada por una bacteria, o se trata de un análogo, un fragmento, una variante, un mutante, o una endopeptidasa sintética derivada de una bacteria. Se puede producir o expresar en la cepa bacteriana de tipo salvaje original, en otra cepa microbiana, o en una planta; es decir, el término engloba la expresión de endopeptidasas de tipo salvaje de origen natural, así como la expresión en cualquier huésped de endopeptidasas recombinantes, modificadas genéticamente o sintéticas.

[0015] En el proceso de la invención, la endopeptidasa puede ser purificada. El término "purificado" usado en este contexto engloba preparaciones de proteínas enzimáticas en las que la preparación ha sido enriquecida para dicha proteína enzimática en cuestión. Dicho enriquecimiento podría ser por ejemplo: la eliminación de las células del organismo a partir del cual se produjo una proteína enzimática extracelular, la eliminación de material no-proteínico por una precipitación proteínica específica o mediante el uso de un procedimiento cromatográfico en el que se adsorbe de forma selectiva la proteína enzimática en cuestión y se eluye de una matriz cromatográfica. Las endopeptidasas pueden haber sido purificadas hasta tal punto que sólo estén presentes cantidades menores de otras proteínas. La expresión "otras proteínas" hace referencia concretamente a otras enzimas. Una endopeptidasa debe ser "sustancialmente pura" para poder usarse en el proceso de la invención, es decir, sustancialmente libre de otros componentes del organismo en que ésta fue producida, que podría tratarse bien de un microorganismo de origen natural o de un microorganismo huésped modificado genéticamente para la producción recombinante de la endopeptidasa.

[0016] No obstante, para los usos según la invención, la endopeptidasa no necesita tener tal grado de pureza. Puede incluir, por ejemplo, otras enzimas o en su caso otras endopeptidasas.

[0017] En un aspecto preferido, la endopeptidasa para ser usada en el método según la invención ha sido purificada para contener al menos un 20%, preferiblemente al menos un 30%, al menos un 40% o al menos un 50% del (p/p) de la endopeptidasa en cuestión de un total de proteína. La cantidad de endopeptidasa puede calcularse a partir de una medición de la actividad de la preparación dividida por la actividad específica de la endopeptidasa (actividad/mg PE), o podría cuantificarse mediante SDS-PAGE o cualquier otro método conocido en la técnica. La cantidad total de proteína puede medirse, por ejemplo, mediante un análisis de aminoácidos.

[0018] El uso de la endopeptidasa según la presente invención puede combinarse con el uso de otras enzimas, por ejemplo, con otras proteasas. En una forma de realización preferida, una endopeptidasa, por ejemplo, la derivada de *Nocardiosis sp.* NRRL 18262, se combina con una exopeptidasa o con una preparación de proteasa con actividad de exopeptidasa, por ejemplo, una preparación de proteasa derivada de *Aspergillus oryzae*, como se divulga en el documento WO94/25580, tal como Flavourzyme® (Novozymes A/S, Dinamarca).

[0019] En una forma de realización particular, la endopeptidasa para uso según la invención tiene una actividad de pH óptima próxima a la neutra cuando se determina por hidrólisis de caseína y posterior reacción de péptidos solubles en ATC con o-ftaldialdehído y 2-mercaptoetanol seguido de la medición de la absorbencia del complejo resultante a 340 nm.

5 [0020] El término actividad de pH óptima próxima a la neutra puede significar que la endopeptidasa tiene un pH óptimo en el intervalo de pH 5.5-11, preferiblemente pH 7-11, más preferiblemente pH 8-11, incluso más preferiblemente pH 9.5-10.5, y de la forma más preferible alrededor de pH 10.

[0021] En otra forma de realización particular, la endopeptidasa para un uso según la invención es termoestable.

10 [0022] El término termoestable puede significar que la temperatura óptima con pH 9 es al menos 50°C o al menos 55°C, preferiblemente al menos 60°C, más preferiblemente al menos 65°C, e incluso más preferiblemente al menos 67°C, tal como entorno a los 70°C, cuando se haya determinado mediante hidrólisis de caseína tal y como se ha descrito anteriormente.

15 Hidrolizado de proteína de trigo

[0023] La proteína de trigo para uso según la invención debe entenderse como proteínas que pueden obtenerse a partir del trigo, así como proteínas aisladas del trigo.

20 [0024] La proteína de trigo puede comprender proteínas de trigo intactas o puede comprender proteínas de trigo parcialmente hidrolizadas.

[0025] En el método de la invención pueden utilizarse una variedad de materiales de proteína de trigo. En general, el material de proteínas de trigo para ser usado debe estar derivado del trigo conforme a los métodos conocidos de la técnica. El material de proteína de trigo puede ser en una forma de realización harina de trigo con un contenido de proteínas de 10-15% de la sustancia seca total, por ejemplo, un contenido de proteínas de aproximadamente 13% de la sustancia seca total. En otra forma de realización, el material de proteína de trigo puede haber sido purificado adicionalmente, por ejemplo, lavando la masa de harina de trigo con agua hasta que el almidón se disuelve y dejando el gluten no soluble como una masa gomosa, la cual se somete a más procedimientos. El material de proteína de trigo puede ser, por ejemplo, concentrado de proteína de trigo o aislado de proteína de trigo, conocido también como concentrado de gluten de trigo o aislado de gluten de trigo. Puede tener un contenido de proteínas superior a 50%, o incluso a 60%, 70%, 80% o a 90%.

35 [0026] El material de proteína de trigo puede haber sido tratado previamente, por ejemplo, como por calentamiento o tratamiento químico con, por ejemplo, ácido, base o clorina.

[0027] En el método de la invención, el material de proteína de trigo normalmente se mezcla o se dispersa en agua para formar un compuesto acuoso comprendiendo aproximadamente de un 1% a aproximadamente un 25% en peso de proteína. En una forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender aproximadamente de un 1% a aproximadamente un 5% en peso de proteínas. En otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender aproximadamente de un 6% a aproximadamente un 10% en peso de proteínas. En otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender aproximadamente de un 11% a aproximadamente un 15% en peso de proteínas. En una forma de realización diferente, el compuesto acuoso puede comprender aproximadamente de un 16% a aproximadamente un 20% en peso de proteínas. En otra forma más de realización, el compuesto acuoso puede comprender aproximadamente de un 21% a aproximadamente un 25% en peso de proteínas. En una forma de realización preferida, el compuesto acuoso puede comprender aproximadamente de un 5% a aproximadamente un 25% en peso de proteínas.

50 [0028] Después de dispersar el material proteico en agua, el pH y/o la temperatura del compuesto acuoso proteico puede ajustarse para optimizar de esta forma la reacción de la hidrólisis, y en particular, para asegurar que la endopeptidasa utilizada en la reacción de hidrólisis funciona cerca de su nivel de actividad óptimo. El pH del compuesto acuoso proteico puede ajustarse y monitorizarse según métodos generalmente conocidos en la técnica. El pH del compuesto acuoso proteico puede ajustarse de aproximadamente 5 a 10. En una forma de realización, el pH del compuesto acuoso proteico puede ajustarse de aproximadamente 6 a 9. En una forma de realización preferida, el pH del compuesto acuoso proteico puede ajustarse de aproximadamente 6.5 a 8. El pH del compuesto acuoso proteico puede mantenerse a tal nivel durante la reacción de hidrólisis o se le puede permitir disminuir conforme avanza la reacción de hidrólisis. La temperatura del compuesto acuoso proteico se ajusta y mantiene preferiblemente desde aproximadamente 45 °C a aproximadamente 70 °C durante la reacción de hidrólisis según los métodos conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, la temperatura del compuesto acuoso proteico debe ajustarse y mantenerse aproximadamente de 63 °C a aproximadamente 70 °C durante la reacción de hidrólisis. En general, las temperaturas superiores a este intervalo pueden desactivar la endopeptidasa, mientras que temperaturas por debajo de este nivel, tienden a ralentizar la actividad de la endopeptidasa.

65 [0029] La reacción de hidrólisis se inicia generalmente añadiendo la endopeptidasa al compuesto acuoso de material proteico. Alternativamente, la enzima se puede dispersar en agua y el material proteico se puede añadir lentamente

mientras se remueve. Éste último método podría ser ventajoso cuando se prepara un compuesto acuoso proteico concentrado, para evitar que la viscosidad sea demasiado elevada.

5 [0030] Preferiblemente, la cantidad de endopeptidasa utilizada en el método según la invención es de aproximadamente 0.005 a aproximadamente 100 UA (tal y como se detalla a continuación) por kg de proteína de trigo, preferiblemente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 UA por kg de proteína de trigo, más preferiblemente de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 30 UA por kg de proteína de trigo.

10 [0031] Una Unidad Anson (UA) se define como la cantidad de enzima que en condiciones estándar (es decir, 25 °C, pH 7.5 y 10 min. de tiempo de reacción) digiere hemoglobina a una velocidad inicial de tal manera que se libera una cantidad de producto soluble en ATC por minuto que da como resultado el mismo color con reactivo de fenol que un miliequivalente de tirosina. Cuando se determina la actividad UA, la concentración de hemoglobina deberá estar entorno al 1.3%.

15 [0032] La cantidad de endopeptidasa añadida al material proteico puede variar y variará dependiendo de la fuente del material proteico, del grado de hidrólisis deseado, y de la duración de la reacción de hidrólisis. La cantidad de endopeptidasa puede variar desde aproximadamente 1 mg de proteína enzimática hasta aproximadamente 5000 mg de proteína enzimática por kilogramo de proteína de trigo. En una forma de realización preferida, la cantidad puede variar desde 1 mg de proteína enzimática hasta aproximadamente 1000 mg de proteína enzimática por kilogramo de proteína de trigo. En otra forma de realización preferida, la cantidad puede variar de aproximadamente 5 mg de proteína enzimática a aproximadamente 500 mg de proteína enzimática por kilogramo de proteína de trigo.

20 [0033] Como será apreciado por el experto en la materia, la duración de la reacción de hidrólisis puede variar y variará. En términos generales, la duración de la reacción de hidrólisis puede oscilar entre minutos y varias horas, por ejemplo, desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 48 horas.

30 [0034] Preferiblemente, el tratamiento con endopeptidasa da lugar a un hidrolizado de proteína de trigo con un grado de hidrólisis (GH) de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 6% o de aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 5%, incluso más preferiblemente de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 3%.

[0035] El grado de hidrólisis (GH) expresa la extensión de la hidrólisis de proteína obtenida por el método. En el contexto de la invención, el grado de hidrólisis (GH) se define de la siguiente manera:

$$35 \quad \text{GH} = (\text{Número de enlaces peptídicos divididos} / \text{Número total de enlaces peptídicos}) \times 100 \%$$

[0036] El experto en la técnica sabrá cómo medir el GH. Puede hacerse por ejemplo, utilizando un método como se describe en Adler-Nissen, J., 1986, Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins, capítulo 5, págs. 122-124.

40 [0037] Después de haber completado el paso b), la endopeptidasa puede ser inactivada. Tal inactivación puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, calentando hasta al menos 75 °C, o hasta al menos 80 °C o al menos 85 °C.

45 [0038] En una forma de realización, el método de la invención comprende además el tratamiento de la composición de proteína de trigo con una o más enzimas adicionales con actividad de proteasa. Estas enzimas proteolíticas adicionales pueden ser una o más endopeptidasas y/o una o más exopeptidasas. La una o más exopeptidasas pueden ser, por ejemplo, una o más aminopeptidasas y/o una o más carboxipeptidasas.

50 [0039] La incubación con la endopeptidasa con al menos un 50% de identidad con la SEC ID n.º: 1 y la incubación con la una o más enzimas adicionales con actividad de proteasa no se realizan simultáneamente. Es decir, si las enzimas proteolíticas no actúan con el mismo pH y/o a la misma temperatura, la composición de proteína de trigo se incubará primero con una (o más) enzima(s) proteolítica, seguido de un ajuste opcional de pH y/o temperatura y posterior incubación con la otra enzima(s) proteolítica.

55 [0040] Cuando se usan una o más enzimas adicionales con actividad de proteasa, el hidrolizado de proteína de trigo resultante puede tener un grado más alto de hidrólisis (GH) que el indicado anteriormente. Puede tener, por ejemplo, un grado de hidrólisis de aproximadamente 5-25%.

60 [0041] En otra forma de realización del método de la invención, el material de proteína de trigo puede someterse a un tratamiento con otras enzimas además del tratamiento con enzima(s) con actividad de proteasa. Tal tratamiento enzimático adicional podrá realizarse antes, al mismo tiempo o después del tratamiento de proteasa, y la enzima adicional podrá ser una o más del grupo comprendiendo amilasa, fitasa, celulasa, hemicelulasa, fosfolipasa, lipasa y xilanasas. Tales otras enzimas pueden utilizarse para proporcionar propiedades al hidrolizado de proteína de trigo, que no son dictadas por la proteína y/o péptidos en el hidrolizado.

65

[0042] Un hidrolizado de proteína de trigo obtenido por el método según la invención puede utilizarse en un producto alimenticio, por ejemplo en una bebida. Un producto alimenticio según la presente invención puede ser cualquier producto destinado al consumo humano. Ejemplos no limitativos de tales productos alimenticios incluyen barritas nutritivas, bebidas en polvo, bebidas para deportistas y bebidas energéticas. Un hidrolizado de proteína de trigo obtenido por el método de la invención puede utilizarse también en nutrición clínica, por ejemplo en hospitales.

EJEMPLO 1

10 *Comparación de hidrólisis de proteína de trigo con endopeptidasa de Nocardopsis sp. NRRL 18262 con la secuencia mostrada en SEC ID n.º: 1 y Alcalase® 2.4L (Novozymes A/S, Dinamarca)*

Hidrólisis con proteasa:

Preparación de proteína:

15

[0043] Gluten vital de trigo de Tate & Lile, 75% de proteína: 15 g + 285 g agua.

El producto de proteína de trigo se suspendió en un 5% de p/v con agua desmineralizada (Milli Q). La proteína se añadió lentamente al agua Milli Q (temperatura ambiente) en un agitador magnético. Se ajustaron las rpm para evitar la formación de espuma. La solución proteínica se dispersó durante 15-30 min.

20

Ajuste de pH:

[0044] Se ajustó el pH a 8.0 con 4 N NaOH y se mantuvo durante la reacción de hidrólisis.

25

Dosificación enzimática:

[0045] La proteasa de *Nocardopsis* se dosificó en 10, 50, 100 y 300 mg de proteína enzimática (pe)/kg de proteína y Alcalase 2.4L se dosificó en 10, 50 y 100 de mg de proteína enzimática (pe)/kg de proteína. La enzima se almacenó en hielo durante su manipulación.

30

Tratamiento enzimático:

[0046]

35

Temperatura: 60 °C +/- 1 °C
Tiempo: 120 min.

Se añadió la enzima a la proteína de trigo en un agitador magnético en un baño de agua. La encima se añadió cuando la temperatura de la solución proteínica alcanzó 60 °C.

40

Inactivación térmica / almacenamiento:

[0047] Inmediatamente después del tratamiento enzimático, las muestras fueron tratadas con calor durante 15 min. a 85°C en un baño de agua con agitación. Las muestras se enfriaron con hielo y fueron refrigeradas a 4 °C durante la noche.

45

[0048] Tras la incubación durante la noche a 4 °C se evaluaron la solubilidad y el grado de hidrólisis.

Solubilidad:

50

[0049] Se midió la solubilidad utilizando un analizador de proteínas/nitrógeno Leco FP 528, midiendo el contenido de proteínas y nitrógeno mediante un método de combustión. El contenido de nitrógeno se midió en la fracción soluble y la solubilidad se calculó como el contenido de nitrógeno en porcentaje de contenido total de sustancia en seco.

Grado de hidrólisis:

55

[0050] El grado de hidrólisis de la suspensión se midió por estadística de pH como se describe en Adler-Nissen, J., 1986, *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*, capítulo 5, págs. 122-124.

Resultados:

[0051]

Grado de hidrólisis:

5

Proteasa konc (mg/kg material de proteína de trigo)	Alcalase	endopeptidasa <i>Nocardiopsis</i>
0 (Referencia)	0.39	
10	0.76	0.46
50	0.81	0.99
100	1.40	1.63
300	-	4.90

Solubilidad pH 6.5:

Proteasa konc (mg/kg material de proteína de trigo)	Alcalase	endopeptidasa <i>Nocardiopsis</i>
0 (Referencia)	5.8	
10	8.9	6.6
50	11.4	21.9
100	17.2	36.4
300	-	61.9

10 Solubilidad pH 4.0

Proteasa konc (mg/kg material de proteína de trigo)	Alcalase	endopeptidasa <i>Nocardiopsis</i>
0 (Referencia)	7.0	
10	12.9	14.3
50	15.3	29.9
100	20.4	29,4
300	-	54.4

Conclusión:

15

[0052] Puede observarse que con una concentración dada de proteasa se obtiene un grado de hidrólisis similar con Alcalase y endopeptidasa *Nocardiopsis*. No obstante, puede percibirse que la solubilidad es generalmente más alta con endopeptidasa *Nocardiopsis* que con Alcalase, ambas con una concentración de proteasa dada y un grado de hidrólisis dado, y ambos con pH 6.5 y 4.0 (hay que tener en cuenta sin embargo, que 10 mg pe/kg es una excepción con pH 6.0).

20

Además, la inspección visual revela una suspensión uniforme al utilizar endopeptidasa *Nocardiopsis* como catalizador mientras que Alcalase no permaneció uniforme en las condiciones dadas (formación de grumos).

LISTADO DE SECUENCIAS

[0053]

5 <110> Novozymes A/S
 <120> Método para la producción de un hidrolizado de proteína de trigo
 <130> 11465.204-WO
10 <160> 1
 <170> Versión de patentIn 3.5
15 <210> 1
 <211> 188
 <212> PRT
 <213> Nocardiosis sp.
20 <400> 1

ES 2 378 285 T3

Ala Asp Ile Ile Gly Gly Leu Ala Tyr Thr Met Gly Gly Arg Cys Ser
 1 5 10 15

Val Gly Phe Ala Ala Thr Asn Ala Ala Gly Gln Pro Gly Phe Val Thr
 20 25 30

Ala Gly His Cys Gly Arg Val Gly Thr Gln Val Thr Ile Gly Asn Gly
 35 40 45

Arg Gly Val Phe Glu Gln Ser Val Phe Pro Gly Asn Asp Ala Ala Phe
 50 55 60

Val Arg Gly Thr Ser Asn Phe Thr Leu Thr Asn Leu Val Ser Arg Tyr
 65 70 75 80

Asn Thr Gly Gly Tyr Ala Thr Val Ala Gly His Asn Gln Ala Pro Ile
 85 90 95

Gly Ser Ser Val Cys Arg Ser Gly Ser Thr Thr Gly Trp His Cys Gly
 100 105 110

Thr Ile Gln Ala Arg Gly Gln Ser Val Ser Tyr Pro Glu Gly Thr Val
 115 120 125

Thr Asn Met Thr Arg Thr Thr Val Cys Ala Glu Pro Gly Asp Ser Gly
 130 135 140

Gly Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Gln Gly Val Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Cys Arg Thr Gly Gly Thr Thr Phe Tyr Gln Glu Val Thr
 165 170 175

Pro Met Val Asn Ser Trp Gly Val Arg Leu Arg Thr
 180 185

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir un hidrolizado de proteína de trigo, comprendiendo:
- a) adición de una endopeptidasa con al menos un 50% de identidad con la SEC ID n.º: 1 a una composición comprendiendo proteína de trigo, e
 - b) incubación para hidrolizar la proteína de trigo.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la endopeptidasa tiene al menos un 60% de identidad con la SEC ID n.º: 1.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en el que la endopeptidasa tiene al menos un 80% de identidad con a SEC ID n.º: 1.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH óptimo de la endopeptidasa se encuentra entre pH 9.5 y pH 10.5.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la temperatura óptima de la endopeptidasa con pH 9 es de al menos 60 °C.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la endopeptidasa es de *Nocardopsis*.
- 25 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se añade la endopeptidasa en una concentración de entre 1 y 1000 mg de proteína enzimática por kg de proteína de trigo.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se añade la endopeptidasa con una actividad de entre 0.01 y 50 UA por kg de proteína de trigo.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición comprende de aproximadamente 5% a aproximadamente 25% de proteína de trigo.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además el tratamiento de la composición de proteína de trigo con una o más enzimas adicionales con actividad de proteasa.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además el tratamiento de la composición de proteína de trigo con una o más exopeptidasas.
- 40 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además el tratamiento de la composición de proteína de trigo con una o más enzimas del grupo comprendiendo amilasa, fitasa, celulasa, hemicelulasa, fosfolipasa, lipasa y xilanasas.
13. Hidrolizado de proteína de trigo producido por el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 45 14. Uso de un hidrolizado de proteína de trigo producido por el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en un producto alimenticio.