

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 377**

51 Int. Cl.:

C12N 9/52 (2006.01)

A23J 3/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **09757486 .7**

96 Fecha de presentación: **29.05.2009**

97 Número de publicación de la solicitud: **2300606**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Método para la producción de un hidrolizado de caseína**

30 Prioridad:
03.06.2008 EP 08157453

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.04.2012

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

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

74 Agente/Representante:
Tomas Gil, Tesifonte Enrique

ES 2 378 377 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 caseína

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 caseína usando una endopeptidasa microbiana.

15 Antecedentes de la invención

[0003] Los hidrolizados de caseína se usan para el enriquecimiento de las proteínas, por ejemplo, en bebidas para deportistas, y en otras bebidas dietéticas, bebidas en polvo, barritas nutritivas, fórmulas para lactantes, etc. Los hidrolizados de caseína en algunos casos han resultado ser menos alergénicos que los hidrolizados de proteína de suero, lo que los hace potencialmente más útiles, por ejemplo, en fórmulas para lactantes. Los hidrolizados de caseína pueden ser fabricados usando enzimas proteolíticas para hidrolizar la caseína. En la fabricación industrial de hidrolizados de caseína, la solubilidad alta o suspendibilidad de la proteína hidrolizada es importante, desde ambos, un punto de vista del proceso, desde un punto de vista puramente de rendimiento/económico y por una sensación en la boca y propiedades sensoriales. Ha sido por lo tanto objeto de los presentes inventores identificar enzimas proteolíticas que son útiles para preparar hidrolizados de caseína con una alta solubilidad, tal como una alta solubilidad con pH bajo y/o una alta solubilidad con un grado de hidrólisis bajo o moderado.

[0004] Las endopeptidasas que han resultado ser 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 relacionadas que son útiles según la invención se describen en los documentos WO88/03947, WO04/111220, WO04/111222, WO04/111223, WO05/123911 y WO04/072279.

[0005] El documento WO 03/007730 divulga un proceso comprendiendo proteína de caseína hidrolizada con una endoproteasa específica de prolina.

Resumen de la invención

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

Descripción detallada de la invención

Endopeptidasa

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

[0008] No hay limitaciones en el origen de la endopeptidasa para uso según la invención. Así, el término endopeptidasa incluye no sólo endopeptidasas naturales o de tipo salvaje, sino también cualquier mutante, variantes, fragmentos, etc., de las mismas, que exhibe actividad de endopeptidasa, al igual que endopeptidasas sintéticas, tal como endopeptidasas redistribuidas. Variantes de endopeptidasa genéticamente modificada se pueden preparar como se conoce generalmente en la técnica, por ejemplo, por mutagénesis dirigida, por PCR (usando un fragmento de PCR con la mutación deseada como uno de los cebadores en las reacciones PCR), o por mutagénesis aleatoria. Ejemplos de variantes de endopeptidasa, como se usan en el presente contexto, son endopeptidasas en las que uno o más aminoácidos han sido eliminados, insertados o sustituidos por otros aminoácidos.

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

65 (i) la endopeptidasa derivada de *Nocardioopsis* sp. NRRL 18262, divulgada en el documento WO01/58276, cuya secuencia se muestra como SEC ID n.º: 1 del presente documento;

(ii) en dopeptidasas con al menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o al menos 95% de identidad de aminoácido con la endopeptidasa de (i);
 (iii) mutantes, variantes o fragmentos de las endopeptidasas de (i) o (ii) exhibiendo actividad de endopeptidasa.

[0010] Para los fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos puede ser determinado usando el programa Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0. El programa Needle implementa 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 apertura del 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 correspondencias 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 correspondencia exacta ocurre cuando las dos secuencias tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones de la coincidencia. La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácido en la secuencia (por ejemplo, la longitud de la SEC ID n.º: 1 es 188).

[0013] Como ejemplos de endopeptidasas bacterianas aplicables para uso según la invención pueden ser mencionadas también la endopeptidasa de *Nocardiopsis alba* (previamente *Nocardiopsis dassonvillei*) NRRL 18133 descrita en el documento WO88/03947, las endopeptidasas de *Nocardiopsis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 4 3235, *Nocardiopsis alba* DSM 15647, *Nocardiopsis* sp. DSM 16424 y la proteasa sintética 22, descritas las cuatro en el documento WO04/111220, la endopeptidasa de *Nocardiopsis prasina* DSM 15648 descrita en el documento WO04/111222, la endopeptidasa de *Nocardiopsis prasina* DSM 15649 descrita en el documento WO04/111223, las endopeptidasas de *Nocardiopsis prasina* (previamente *Nocardiopsis alba*) DSM 14010, *Nocardiopsis alkaliphila* DSM 44657 y *Nocardiopsis lucentensis* DSM 44048, descritas 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* de CBS 114003, descritas las 6 en WO04/072279, y mutantes, variantes o fragmentos de cualquiera de éstas que muestren 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 derivada de, o tiene origen en, una bacteria, o es 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 abarca la expresión de endopeptidasas de tipo salvaje de origen natural, al igual que la expresión en cualquier huésped de endopeptidasas recombinantes, genéticamente modificadas o sintéticas.

[0015] En el proceso de la invención, la endopeptidasa puede ser purificada. El término "purificada" como se utiliza en este caso abarca preparaciones de proteína enzimática en las que la preparación ha sido enriquecida para la proteína enzimática en cuestión. Tal enriquecimiento podría ser por ejemplo: la eliminación de las células del organismo del cual se produjo una proteína enzimática extracelular, la eliminación de material no-proteínico por una precipitación específica de proteína o el uso de un procedimiento cromatográfico en el que la proteína enzimática en cuestión se adsorbe de forma selectiva y se eluye de una matriz cromatográfica. La endopeptidasa puede haber sido purificada a una extensión tal que sólo haya presentes cantidades menores de otras proteínas. La expresión "otras proteínas" se refiere en particular a otras enzimas. Una endopeptidasa para ser usada en el método de la invención puede ser "sustancialmente pura", es decir, sustancialmente libre de otros componentes del organismo en el que fue producido, que puede ser, bien un microorganismo de origen natural o un microorganismo huésped genéticamente modificado 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, por ejemplo, incluir otras enzimas, incluso otras endopeptidasas.

[0017] En un aspecto preferido, la endopeptidasa para ser usada en el método de 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% (p/p) de la endopeptidasa en cuestión de un total de proteína. La cantidad de endopeptidasa se puede calcular a partir de una medición de actividad de la preparación dividida por la actividad específica de la endopeptidasa (actividad/mg PE), o se puede cuantificar por SDS-PAGE o cualquier otro método conocido en la técnica. La cantidad total de proteína puede ser medida, por ejemplo, por análisis de aminoácido.

[0018] El uso de la endopeptidasa según la presente invención se puede combinar con el uso de otras enzimas, por ejemplo, otras proteasas. En una forma de realización preferida, una endopeptidasa, por ejemplo, la que se deriva de *Nocardiopsis* sp. NRRL 18 262, se combina con una exopeptidasa o una preparación de proteasa con actividad de exopeptidasa, por ejemplo, una preparación de proteasa derivada de *Aspergillus oryzae*, como descrito 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 cercana a la neutra, cuando se determina por hidrólisis de caseína y reacción posterior de péptidos ATC-solubles con oftaldialdehído y 2-mercaptoetanol seguido de la medición de la absorbencia del complejo resultante a 340 nm.

5 [0020] El término actividad de pH óptima cercana 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 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 aproximadamente 70 °C, cuando se determina por hidrólisis de caseína como se ha descrito anteriormente.

15 Hidrolizado de caseína

[0023] En el contexto de la presente invención, la caseína es el grupo predominante de proteínas en la leche, que puede dar cuenta del 75-80% de todas las proteínas en la leche y el queso. La forma soluble de la caseína se puede coagular con ácidos y/o con cuajo.

20 [0024] En una forma de realización preferida, la caseína es de leche de vaca.

[0025] La caseína para ser usada en el método de la invención puede, por ejemplo, estar en forma de caseinato sódico, caseinato de potasio o caseinato de calcio.

25 [0026] En el método de la invención, el material de caseína es típicamente mezclado o dispersado en agua para formar un compuesto acuoso comprendiendo alrededor de un 1% hasta aproximadamente un 25% en peso de proteína. En una forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender de aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 5% en peso de proteína. En otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender de aproximadamente un 6% hasta aproximadamente un 10% en peso de proteína. En otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender de aproximadamente un 11% hasta aproximadamente un 15% en peso de proteína. En otra forma de realización, el compuesto acuoso puede comprender de aproximadamente un 16% hasta aproximadamente un 20% en peso de proteína. En otra forma de realización adicional, el compuesto acuoso puede comprender de aproximadamente un 21% hasta aproximadamente un 25% en peso de proteína. En una forma de realización preferida, el compuesto acuoso puede comprender de aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 25% en peso de proteína.

30 [0027] Después de que el material de proteína se ha dispersado en agua, el pH y/o 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 monitorizar según los métodos generalmente conocidos en la técnica. El pH del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar a partir de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 10. En una forma de realización, el pH del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar de aproximadamente 6 hasta aproximadamente 9. En una forma de realización preferida, el pH del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar a partir de aproximadamente 6.5 hasta aproximadamente 8. El pH del compuesto acuoso de proteína se puede mantener a tal nivel durante la reacción de hidrólisis o se le puede permitir reducirse a medida que avanza la reacción de hidrólisis. La temperatura del compuesto acuoso de proteína se ajusta preferiblemente y se mantiene de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 70 °C durante la reacción de hidrólisis conforme a los métodos conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, la temperatura del compuesto acuoso de proteína se puede ajustar y mantener de aproximadamente 63 °C hasta aproximadamente 70 °C durante la reacción de hidrólisis. En general, las temperaturas superiores a este intervalo pueden inactivar la endopeptidasa, mientras que las temperaturas inferiores o superiores a este intervalo tienden a ralentizar la actividad de la endopeptidasa.

40 [0028] La reacción de hidrólisis se inicia generalmente añadiendo la endopeptidasa al compuesto acuoso de material de proteína. Alternativamente, la enzima se puede dispersar en agua y el material de proteína se puede añadir lentamente mientras se remueve. Éste último método puede ser ventajoso al preparar un compuesto acuoso de proteína concentrado para evitar que la viscosidad se vuelva demasiado alta.

55 [0029] Preferiblemente, la cantidad de endopeptidasa usada en el método de la invención es de aproximadamente 0.005 hasta aproximadamente 100 UA (como se define a continuación) por kg de caseína, preferiblemente de aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 50 UA por kg de caseína, más preferiblemente de aproximadamente 0.02 hasta aproximadamente 30 UA por kg de caseína.

60 [0030] Una Unidad Anson (UA) se define como la cantidad de enzima que en condiciones estándar (es decir 25 °C, pH 7.5 y 10 minutos de tiempo de reacción) digiere hemoglobina a una velocidad inicial tal que por minuto se libera una cantidad de producto soluble ATC que da el mismo color con reactivo de fenol como un miliequivalente de tirosina. Cuando se determina la actividad de UA, la concentración de hemoglobina puede estar preferiblemente alrededor de

1.3%.

5 [0031] La cantidad de endopeptidasa añadida al material de proteína puede variar y variará dependiendo de la fuente del material de proteína, el grado de hidrólisis deseado y 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 caseína. En una forma de realización preferida, la cantidad puede variar de 1 mg de proteína enzimática hasta aproximadamente 1000 mg de proteína enzimática por kilogramo de caseína. En otra forma de realización preferida, la cantidad puede variar desde aproximadamente 5 mg de proteína enzimática hasta aproximadamente 500 mg de proteína enzimática por kilogramo de caseína.

10 [0032] 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 variar desde unos pocos minutos a varias horas, tal como, desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 48 horas.

15 [0033] Preferiblemente, el tratamiento con endopeptidasa da como resultado un hidrolizado de caseína con un grado de hidrólisis (GH) de desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 20%, más preferiblemente desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 10% o de desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 8%, incluso más preferiblemente desde aproximadamente 2% hasta aproximadamente 8%.

20 [0034] 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:

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

25 [0035] El experto en la técnica sabrá cómo medir el GH. Puede, por ejemplo, hacerse usando un método como se describe en Adler-Nissen, J., 1986, *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*, capítulo 5, págs. 122-124.

30 [0036] Después de haber completado el paso b), se puede inactivar la endopeptidasa. Tal inactivación se puede realizar mediante cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, por calentamiento hasta al menos 75 °C, así como por ejemplo hasta al menos 80 °C o al menos 85 °C.

35 [0037] En una forma de realización, el método de la invención comprende además el tratamiento de la composición de caseína con una o más enzimas adicionales con actividad de proteasa. Tal enzima proteolítica adicional puede 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.

40 [0038] 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 pueden ser realizadas simultáneamente. Es decir, si las enzimas proteolíticas no actúan con el mismo pH y/o la misma temperatura, la composición de caseína se puede incubarse con una (o más) enzima(s) proteolítica(s) primeramente, seguido de un ajuste opcional de pH y/o temperatura e incubación posterior con la(s) otra(s) enzima(s) proteolítica(s).

45 [0039] Cuando se usan una o más enzimas adicionales con actividad de proteasa, el hidrolizado de caseína 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%.

50 [0040] Un hidrolizado de caseína obtenido por el método de la invención se puede utilizar en un producto alimenticio, por ejemplo, en una bebida. Un producto alimenticio según la presente invención puede ser cualquier producto destinado para consumo humano. Ejemplos no limitativos de tales productos alimenticios incluyen barritas nutritivas, bebidas en polvo, bebidas para deportistas, bebidas energéticas y fórmulas para lactantes. Un hidrolizado de caseína obtenido por el método de la invención puede ser usado también en nutrición clínica, por ejemplo, en hospitales.

Ejemplo 1

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

Hidrólisis con proteasa:

60 *Preparación de proteína:*

[0041] Caseinato sódico, Miprodan 30 de Arla Foods, Dinamarca, 88% de proteína: 15 g + 285 g de agua. El producto de caseinato se suspendió en una suspensión de 5% p/v con agua desmineralizada (Milli Q). El agua se calentó a 60 °C, y la proteína se añadió al agua Milli Q mientras se removía en un mezclador, 1-2 minutos o hasta que la proteína quedó suspendida/solubilizada.

Ajuste de pH:

[0042] El pH se ajustó a 8.0 con 4 N NaOH y se mantuvo durante la reacción de hidrólisis.

5 *Dosificación enzimática:*

[0043] La proteasa de *Nocardiopsis* y Alcalase 2.4L se dosificaron en 10, 50 y 100 mg de proteína enzimática (pe)/kg de proteína. La enzima se almacenó en hielo durante la manipulación.

10 *Tratamiento enzimático:*

[0044]

Temperatura: 60 °C +/- 1 °C

15 Tiempo: 120 min.

[0045] La enzima se añadió a la suspensión de proteína en un agitador magnético en un baño de agua. La enzima se añadió cuando la temperatura en la solución de proteína alcanzó 60 °C.

20 *Inactivación térmica / almacenamiento:*

[0046] Inmediatamente después del tratamiento enzimático, las muestras se trataron térmicamente durante 15 min. a 85 °C en un baño de agua con agitación. Las muestras se enfriaron en hielo y se refrigeraron a 4 °C durante la noche.

25 [0047] Tras la incubación a 4°C durante la noche, se evaluaron la solubilidad y el grado de hidrólisis.

Solubilidad:

30 [0048] La solubilidad se midió con pH 4.0 y 6.5 usando un analizador de proteína/nitrógeno Leco FP 528 midiendo el contenido de proteína y nitrógeno por 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 del contenido total de materia seca.

Grado de hidrólisis:

35 [0049] El grado de hidrólisis de la suspensión se midió por estadística pH como se describe en Adler-Nissen, J., 1986, *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*, capítulo 5, págs. 122-124.

Resultados:

40 [0050] Grado de hidrólisis:

Proteasa konc (mg/kg material de caseinato)	Alcalase	Endopeptidasa de <i>Nocardiopsis</i>
0 (Referencia)	0.62	
10	2.87	2.42
50	7.17	5.61
100	10.92	7.30

Solubilidad pH 6.5:

45 [0051]

Proteasa konc (mg/kg material de caseína)	Solubilidad		Solubilidad / GH	
	Alcalase	Endopeptidasa de <i>Nocardiopsis</i>	Alcalase	Endopeptidasa de <i>Nocardiopsis</i>
0 (Referencia)	98.7		-	
10	76.5	92.1	26.7	38.1
50	79.0	90.3	11.0	16.1
100	86.9	95.2	8.0	13.0

Solubilidad pH 4.0:

[0052]

Proteasa konc (mg/kg material de caseína)	Solubilidad		Solubilidad / GH	
	Alcalase	Endopeptidasa de <i>Nocardioptis</i>	Alcalase	Endopeptidasa de <i>Nocardioptis</i>
0 (Referencia)	5,4		-	
10	29.3	42.0	10.2	17.4
50	73.3	70.4	10.2	12.6
100	84.5	73.9	7.7	10.1

5

Conclusión:

[0053] Se puede observar que con una concentración de proteasa dada, la endopeptidasa de *Nocardioptis* dio un grado similar o moderadamente inferior de hidrólisis que Alcalase. No obstante, con pH 6.5 se observó que la solubilidad fue generalmente más alta con endopeptidasa de *Nocardioptis* que con Alcalase, ambas con una concentración de proteasa dada y con un grado de hidrólisis dado. También con pH 4.0, la solubilidad / GH fue claramente más alta para el hidrolizado obtenido con la endopeptidasa de *Nocardioptis* que para el hidrolizado obtenido con Alcalase. Con pH 6.5, la solubilidad del control no hidrolizado fue superior que la de los productos hidrolizados. Pero desde un punto de vista funcional, es decir, en cuanto a la capacidad emulsionante y alergenicidad, es deseable frecuentemente tener una cierta hidrólisis de proteína (aumento en GH). Mientras que desde un punto de vista sensorial, el GH no debería ser demasiado alto, ya que un GH aumentado frecuentemente da lugar a un amargor aumentado de los hidrolizados de caseína.

[0054] Además, una inspección visual reveló una suspensión uniforme con el uso de endopeptidasa de *Nocardioptis* como el catalizador, mientras que Alcalase en las condiciones dadas no era uniforme (formación de grumos).

Listado de secuencias

[0055]

25

<110> Novozymes A/S

<120> Método para la producción de un hidrolizado de caseína

30

<130> 11466.204-WO

<160> 1

<170> Versión de patentIn 3.5

35

<210> 1

<211> 188

<212> PRT

<213> *Nocardioptis* sp.

40

<400> 1

ES 2 378 377 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

1. Método para la producción de un hidrolizado de caseína, comprendiendo:
- 5 a) adición de una endopeptidasa con al menos un 50% de identidad con la SEC ID n.º: 1 a una composición comprendiendo caseína, e
 b) incubación para hidrolizar la caseína.
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.
- 10 3. Método según la reivindicación 1, en el que la endopeptidasa tiene al menos un 80% de identidad con la SEC ID n.º: 1.
- 15 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el pH óptimo de la endopeptidasa está entre pH 9.5 y pH 10.5.
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.
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la endopeptidasa es de *Nocardioopsis*.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la endopeptidasa se añade con una concentración de entre 1 y 1000 mg de proteína enzimática por kg de caseína.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la endopeptidasa se añade con una actividad de entre 0.01 y 50 UA por kg de caseína.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición comprende desde aproximadamente 5% hasta aproximadamente 25% de caseína.
- 30 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el hidrolizado de caseína tiene un grado de hidrólisis de al menos 2%.
- 35 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además el tratamiento de la composición de caseína con una o más enzimas adicionales con actividad de proteasa.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además el tratamiento de la composición de caseína con una o más exopeptidasas.
- 40 13. Hidrolizado de caseína producido por el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
14. Uso de un hidrolizado de caseína producido según el método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12 en un producto alimenticio.