

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 444 215**

51 Int. Cl.:

**A23J 3/04** (2006.01)

**B01D 61/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2003 E 03794357 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 1545235**

54 Título: **Método para la producción de péptidos y aminoácidos a partir de material de origen animal que comprende proteínas**

30 Prioridad:

**29.07.2002 NO 20023601**

**29.07.2002 NO 20023602**

**29.07.2002 NO 20023603**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**24.02.2014**

73 Titular/es:

**ZYMTECH PRODUCTION AS (100.0%)**

**2665 Lesja, NO**

72 Inventor/es:

**CARLSSON, TOMAS**

74 Agente/Representante:

**MILTENYI, Peter**

**ES 2 444 215 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 péptidos y aminoácidos a partir de material de origen animal que comprende proteínas

La presente invención se refiere a aspectos relativos a un método para producir un producto libre de proteínas que contiene péptidos, aminoácidos libres y minerales a partir de materiales de partida animales o acuáticos, para su uso como piensos y/o en productos para las industrias biotecnológica, farmacéutica y de procesamiento de alimentos.

En la industria, se conoce la producción de péptidos y aminoácidos mediante hidrólisis ácida y mediante el uso de enzimas concentradas, biotecnológicas y/o químicas/técnicas, tanto naturales como sintetizadas. La presente invención es un modo de usar las enzimas de descomposición que se producen de manera natural a partir de materiales de partida animales o acuáticos en un procedimiento industrial que da lugar a un producto de calidad farmacéutica, calidad biotecnológica, calidad como producto alimenticio o calidad médica veterinaria.

Mediante el término "calidad farmacéutica" se quiere decir productos para uso intravenoso y productos que se clasifican como medicamentos para seres humanos y animales o medicamentos naturales.

Mediante el término "calidad biotecnológica" se quiere decir productos que pueden usarse, por ejemplo, como medios de cultivo o catalizadores en el cultivo de células, bacterias, hongos y algas.

Mediante el término "calidad como producto alimenticio" se quiere decir productos que se usan para el consumo humano o bien como aditivo o bien como producto independiente.

Mediante el término "calidad médica veterinaria" se quiere decir productos que se clasifican como medicamentos para animales.

La invención también puede usarse opcionalmente para producir productos alimenticios en forma de aditivo o como productos independientes.

Se conocen bien aminoácidos y péptidos en las industrias farmacéutica, de medicina natural y médica veterinaria como constituyentes de productos tales como alimentos intravenosos y como alimentos especiales para aliviar determinados traumatismos. Hasta la fecha, son principalmente extractos de plasma sanguíneo e hidrolizado de proteínas producidos usando enzimas pancreáticas de cerdos y terneros los que se han usado en esta área. La invención proporciona a la industria farmacéutica la posibilidad de obtener un suministro de aminoácidos y péptidos de una calidad hasta ahora desconocida.

También se usan aminoácidos y péptidos ultracortos para procesos biotecnológicos, por ejemplo, cuando va a producirse un medio de cultivo sumamente potente. Una limitación para toda la industria que cultiva organismos unicelulares o sustratos celulares procedentes de organismos superiores es el suministro de medios de cultivo de calidad adecuada. Factores limitantes son defectos o un alto precio. Además, los aminoácidos o péptidos producidos mediante métodos biotecnológicos generalmente contienen sustancias que inhiben el crecimiento que pueden evitarse usando los productos producidos mediante el método de la invención. La combinación de espectros de aminoácidos naturales y micronutrientes/minerales biológicos producidos mediante el procedimiento descrito da lugar a un producto único para la preparación de medios de cultivo para la industria biotecnológica. Además, la técnica puede reciclar proteínas procedentes de muchos tipos de cultivos de nuevo a aminoácidos y péptidos que entonces pueden reutilizarse.

Los péptidos/aminoácidos se usan en la industria de procesamiento de alimentos como aglutinantes, emulsionantes, aditivos saborizantes y similares. Los usos son considerables y van en aumento. Los péptidos y aminoácidos más usados en la industria de procesamiento de alimentos se derivan de la soja y la leche. Se sabe que los aminoácidos y péptidos procedentes de la soja y la leche en particular producen reacciones alérgicas que sólo pueden evitarse usando otra composición de péptidos/aminoácidos que no se derive de estas fuentes, o una composición de péptidos/aminoácidos procedentes de soja o leche que se ha modificado suficientemente para no provocar estas reacciones. Por tanto, hay una gran necesidad de un método que proporcione una composición de aminoácidos y péptidos que también pueda derivarse de soja y/o leche, pero que no produzca reacciones alérgicas. Los productos procedentes de la mayoría de fuentes animales no han logrado el mismo grado de utilización ya que no existen técnicas de extracción que mantengan la funcionalidad del producto mientras que eliminan componentes no deseados que reducen la calidad tales como sal y grasa.

Se usan muchas composiciones diferentes de proteínas, péptidos y aminoácidos que derivan de fuentes diferentes en la producción de piensos. La composición de los péptidos, los aminoácidos y las proteínas también es muy importante en la producción de alimentos, ya que el potencial de crecimiento de los animales depende de una ingesta de alimentos equilibrada. Por tanto, también en esta área, hay una gran necesidad de un método que produzca cualquier composición deseada que proporcione condiciones de crecimiento óptimas para los animales.

A continuación, el término enzimas "endógenas" se usa como término para las enzimas que se originan dentro del producto proteico, en contraposición a las enzimas "exógenas" que son enzimas externas añadidas al material proteico de partida durante la hidrólisis tradicional. Un ejemplo de una enzima "exógena" es la "deterzima APY", que

es una proteasa bacteriana (E.C. 3.4.21) preparada mediante fermentación controlada de *Bacillus alcalophilus* y que puede adquirirse de varios proveedores. El término enzimas “endógenas” también se usa para referirse a enzimas extraídas de otros materiales de partida o materiales enzimáticos naturales similares, preferiblemente de animales de sangre fría.

- 5 El término “hidrolizado” se usa en el texto a continuación como designación para los materiales de partida que se están procesando, es decir, que la mezcla calentada y con pH ajustado de material de partida y agua constituye el hidrolizado. Esto se aplica en particular a los aspectos a) y b) de la invención.

Hay varias patentes en el campo de la invención, como por ejemplo el documento RU 2103360 que describe un medio nutriente para cultivar células eucariotas y un método para preparar un hidrolizado de componentes internos de pescado que se prepara mediante hidrólisis proteolítica. Este procedimiento de hidrólisis se lleva a cabo a alto pH ajustado con hidróxido de sodio, usando inactivación por temperatura, filtración y secado en el que los despojos de pescado se mezclan con agua destilada en una razón de 1:1. La hidrólisis se lleva a cabo a una temperatura de +40° - + 42°C hasta que se obtiene un porcentaje en peso de nitrógeno del grupo amino del 5,5-6-5% y un porcentaje en peso de aminoácidos libres del 50-60%.

- 15 El documento SU 1755417 también da a conocer un método para la producción de hidrolizados a partir de material de partida de pescado en un fermentador al que se añade una preparación de fermentación, seguido por filtración y secado del hidrolizado producido, en el que se usa material de partida no triturado que se alimenta de manera periódica al interior del fermentador.

El documento RU 1559466 describe un método para la producción de hidrolizados, que requiere triturar productos de pescado o sobras procedentes del procesamiento de los mismos, mezclar con agua, calentar la mezcla, añadir una preparación de fermentación proteolítica, fermentar, filtrar y secar, en el que los materiales de partida y el agua se mezclan en una razón de 2:1-1:1, y se calientan hasta una temperatura de +40°-+45°C, mientras que la fermentación se lleva a cabo a lo largo de un periodo de 0,5 – 2,5 horas usando la enzima exógena protosubtilina G3x.

- 25 También se hace referencia al documento FR 2168259 que describe una hidrólisis enzimática de proteínas de pescado que se lleva a cabo triturando pescado fresco dando lugar a una pasta fina sin añadir agua. Se añaden enzimas exógenas y la pasta se hidroliza durante aproximadamente 15 horas dependiendo de la solubilidad deseada. El producto se estabiliza durante 5-20 minutos a +90° - +100°C y se filtra, pasteuriza y centrifuga. El procedimiento da lugar a productos de alto valor nutritivo.

- 30 Los documentos SU 1737798 y US 5356637 también dan a conocer procedimientos para la hidrólisis de proteínas.

Tal como se muestra anteriormente, se conocen diferentes técnicas para liberar proteínas, péptidos y aminoácidos de pescado que son adecuadas para la producción de alimentos. Además, también se conoce preparar aceite/grasa a partir de materiales de partida de fuentes tanto vegetales como animales.

- 35 Según el aspecto a), el objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir hidrolizado de proteínas libre de proteínas basado en el uso de enzimas naturales sin la adición de ninguna sustancia no natural. Esto es en contraposición a otros métodos que usan enzimas procedentes de muchas fuentes diferentes, tales como de cultivos bacterianos o similares.

También es un objeto que el procedimiento debe proporcionar un producto que esté completamente libre de proteínas y ADN y otras sustancias alérgicas y que esto se realice sin afectar adversamente a la utilización de los materiales de partida. También se desea que el método reduzca la grasa en el producto final hasta un nivel tan bajo que se eliminen las desventajas de usar materiales de partida de pescado. Se desea producir un producto que pueda usarse en muchas áreas diferentes en las que el uso de productos producidos mediante métodos conocidos se ha limitado o se ha hecho imposible debido a su contenido en grasa.

- 45 También es un objeto utilizar los materiales de partida en su totalidad y garantizar que las tensiones medioambientales asociadas con la producción sean mínimas.

Según la presente invención, el objeto es proporcionar un método para producir un hidrolizado de proteínas basándose en el uso de enzimas naturales sin la adición de ninguna sustancia no natural. Esto es en contraposición con otros métodos que usan enzimas procedentes de muchas fuentes diferentes tales como cultivos bacterianos y similares.

- 50 Además, es un objeto que el procedimiento según el aspecto c) debe proporcionar un producto que esté completamente libre de proteínas y ADN y otras sustancias alérgicas y que esto se realice sin afectar adversamente a la utilización de los materiales de partida. También se desea que el método reduzca la grasa en el producto final hasta un nivel tan bajo que se eliminen las desventajas de usar materiales de partida de pescado. Se desea producir un producto que pueda usarse en muchas áreas diferentes en las que el uso de productos producidos mediante métodos conocidos se ha limitado o se ha hecho imposible debido a su contenido en grasa.

También es un objeto utilizar los materiales de partida en su totalidad y garantizar que las tensiones medioambientales asociadas con la producción sean mínimas.

Por tanto, según la invención se proporciona un método para recuperar péptidos/aminoácidos y aceite/grasa a partir de un material de partida que contiene proteínas, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

- 5 a. moler los materiales de partida;
- b. calentar los materiales de partida molidos hasta temperaturas en el intervalo de 40-62°C, preferiblemente 45-58°C;
- c. opcionalmente antes y/o después, separar el aceite/grasa del material de partida para obtener un primer producto de aceite;
- 10 d. añadir agua que tiene aproximadamente la misma o la misma temperatura que el material de partida, y en el que se ajusta el pH del agua añadiendo calcio;
- e. hidrolizar los materiales de partida con enzimas endógenas o enzimas procedentes de materiales de partida similares, preferiblemente de especies de sangre fría, para preparar un hidrolizado;
- 15 f. opcionalmente durante la etapa de hidrólisis, añadir un regulador de pH para mantener el valor de pH deseado del hidrolizado;
- g. eliminar las partículas sólidas y proteínas no hidrolizadas que pueden devolverse a la hidrólisis del hidrolizado;
- h. separar de manera periódica o continua grasa/aceite para obtener un segundo producto de aceite;
- i. opcionalmente tratar el hidrolizado contra el crecimiento de microorganismos, preferiblemente con tratamiento UV;
- 20 j. separar la fracción de peso molecular de péptidos/aminoácidos deseada mediante filtración de membrana, preferiblemente de tipo de flujo cruzado;
- k. enviar las porciones del hidrolizado que no penetran en el filtro de membrana en el punto j de nuevo a la hidrólisis en la etapa e;
- l. concentrar y opcionalmente secar el permeado para obtener péptidos/aminoácidos;
- 25 m. devolver completa o parcialmente el destilado procedente de la etapa de concentración al lado del permeado del filtro de membrana.

Las realizaciones preferidas del método según la invención se exponen en las reivindicaciones dependientes 2-7 adjuntas.

30 El término "filtro de membrana" se usa en este contexto para referirse a filtros de tipo membrana, tales como filtros de membrana, filtros osmóticos, ultrafiltros, filtros electrostáticos, filtros de flujo cruzado y similares. Estos deben caracterizarse preferiblemente por un valor de punto de corte inferior o igual a 10.000 daltons.

35 Además, se proporciona un método, tal como se da a conocer en la reivindicación 8, para la hidrólisis de uno más materiales de partida que contienen proteínas y la separación de aminoácidos/péptidos, que se caracteriza porque la hidrólisis se lleva a cabo usando las enzimas endógenas del material o materiales de partida que contiene(n) proteínas y porque el hidrolizado se hace pasar a través de un filtro de membrana, en el que los péptidos/aminoácidos siguen una corriente de permeado, mientras que las enzimas activas descomponen de manera continua cualquier residuo de proteínas que se deposite sobre la superficie de la membrana y las enzimas se hacen pasar junto con el material retenido de nuevo a la hidrólisis.

El aceite producido mediante el método según la invención se caracteriza porque no contiene alérgenos ni trazas de ADN.

40 Finalmente, la hidroxiapatita producida mediante el método según la invención se caracteriza porque no contiene alérgenos ni trazas de ADN.

Por una parte, la presente invención resuelve el problema de proporcionar productos que tienen un amplio espectro de calidad que varía desde su uso para la producción de alimentos hasta su uso en productos que van a satisfacer los requisitos para productos farmacéuticos y similares, por ejemplo.

45 Por otra parte, la presente invención resuelve este problema mediante el uso de las enzimas endógenas de los materiales de partida y adaptando las condiciones de producción a estas enzimas.

Esta invención combina el uso de enzimas endógenas con una técnica para recuperar moléculas de tamaño

determinado específicas desde aminoácidos sencillos hasta péptidos grandes ligeramente inferiores a 10.000 daltons.

La invención implica retener las enzimas en el proceso de fermentación mientras que los aminoácidos y péptidos liberados se separan.

- 5 La invención también se refiere a que el procedimiento de hidrólisis puede realizarse de manera continua con la adición de más materiales de partida durante el procedimiento.

El procedimiento difiere esencialmente de procedimientos de tratamiento con enzimas de la técnica anterior en que se lleva a cabo o puede llevarse a cabo:

- sin aditivos, tales como cloroformo para evitar el crecimiento bacteriano no deseado;

- 10 - sin la adición de hidróxido de sodio;

- con la posibilidad de recuperación en caliente y en frío de aceite marino/grasa marina estéril y libre de proteínas;

- con la posibilidad de controlar el espectro de aminoácidos libres y péptidos en el producto final en la selección de materiales de partida para el procedimiento eligiendo materiales de partida específicos;

- 15 - con la posibilidad de controlar el resultado del procedimiento, en lo que se refiere a la composición de aminoácidos y péptidos, por medio de los parámetros del procedimiento aplicados tales como temperatura y pH;

- sin la adición de ácido;

- con una combinación flexible de materiales de partida diferentes;

- mediante el uso de una etapa adaptada de concentración para separar fracciones de producto;

- mediante el uso de un procedimiento de degradación enzimática continuo;

- 20 - sin coagulación de proteínas y/o péptidos cuando se usa un ácido o una base; y

- mediante la clasificación por tamaños de los péptidos producidos;

se da lugar a un producto que contiene minerales y micronutrientes de origen biológico.

Por tanto, se proporciona un método para recuperar péptidos/aminoácidos, minerales y aceite o grasa a partir de materiales proteicos preferiblemente de origen acuático.

- 25 La técnica anterior difiere de la presente invención en que es un método básicamente diferente para preparar proteínas de pescado, que también se encuentran en diferentes fracciones que contienen péptidos y aminoácidos. Las condiciones de producción también difieren esencialmente de esta técnica y con la presente invención se evita el uso de enzimas exógenas. Además, como también se enseña en el material citado mencionado anteriormente, se producen aceites marinos/grasas marinas de alta calidad mediante la presente invención desarrollando un método específico diferente que no se describe en la técnica anterior.
- 30

- El método descrito en un tratamiento con enzimas natural de proteínas con el objeto de obtener productos finales secos o productos líquidos que contienen diferentes composiciones de péptidos y aminoácidos libres. El procedimiento da lugar a productos terminados que contienen opcionalmente desde el 5% hasta el 100% de aminoácidos libres. El producto no contiene alérgenos ni trazas de ADN. Sólo hay cantidades muy pequeñas de
- 35 grasa, normalmente inferiores al 0,1% y micronutrientes biológicos. El método según la invención proporciona un producto que es completamente útil como medio de cultivo para todos los tipos de cultivo, incluyendo células procedentes de organismos superiores.

- La presente invención permite un método sin el uso de hidróxido de sodio que puede dar como resultado problemas en la producción de aminoácidos y péptidos a escala industrial. Además, la razón de agua puede variarse hasta un
- 40 grado superior que en la técnica anterior y el porcentaje en peso de aminoácidos libres también está en un intervalo mayor.

- En comparación con esta técnica, se usa tanto material de partida triturado como no triturado en la presente invención, y no hay adición de una preparación de fermentación, sino que se usan enzimas naturales que ya están presentes en el material de partida. Por tanto, se usan las enzimas endógenas del material proteico de partida y esto
- 45 da como resultado una forma más sencilla, más estable y menos cara de llevar a cabo la hidrólisis. Además, las condiciones deben adaptarse directamente a las condiciones de actividad de las enzimas endógenas que también son diferentes de las de la técnica anterior.

Otro problema encontrado en esta industria es que las enzimas exógenas son caras y pueden ser de calidad

variable. La presente invención evita este problema mediante un reciclado de las enzimas endógenas.

5 Además, las enzimas activas tienen una función de limpieza específica. Puesto que quedan retenidas en el filtro, estas enzimas actúan sobre proteínas y péptidos no filtrados. Las enzimas producen la descomposición de estos materiales y por tanto el filtro tiene una vida más larga en comparación con los procesos de filtración tradicionales usados en los procedimientos de hidrólisis conocidos hasta ahora. Esto es una gran ventaja en lo que se refiere a los costes, el tiempo de vida y la eficacia de los filtros, la calidad de los productos y el nivel de utilización del sistema o procedimiento.

10 Además, el método describe la recuperación de aceites/grasa y sólidos. Uno de los sólidos que pueden obtenerse mediante el método según la invención es la hidroxiapatita. La hidroxiapatita se usa, por ejemplo, en biocromatografía y otros procedimientos de separación biológica, en RMN y otros procedimientos de detección, y es por tanto un subproducto comercialmente interesante del procedimiento.

La elección de la técnica y los parámetros del procedimiento determinará qué producto final se obtiene. De esta forma, será posible adaptar productos a los requisitos del consumidor.

La figura 1 muestra una planta en la que se usa el procedimiento de hidrólisis según la invención.

15 Ahora se describirá en más detalle la realización de la invención.

Los números de referencia en la figura 1 representan las siguientes partes de la planta:

301 = Fermentador

302 = Unidad de separación para la eliminación de partículas sólidas, preferiblemente un tamiz

303 = Unidad de separación, preferiblemente una centrífuga del tipo decantador

20 304 = Tanque de flotación para separar proteínas e hidroxiapatita

305 = Unidad de separación para separar aceite, preferiblemente una centrífuga

306 = Unidad de filtro para filtración estéril

307 = Tanque para aceite/grasa

308 = Unidad de reducción de microorganismos

25 309 = Unidad de filtro de membrana

310 = Unidad de concentración

311 = Unidad de secado

312 = Equipo de molienda

313 = Centrífuga, preferiblemente del tipo decantador

30 314 = Filtro de aceite

315 = Tanque para aceite recuperado antes de la etapa de hidrólisis

316 = Intercambiador de calor para calentar materiales de partida

317 = Unidad de dosificación de calcio

318 = Intercambiador de calor para calentar el agua

35 319 = Dispositivo para suministrar harina de huesos

320 = Dispositivo para añadir nitrógeno

321 = Recipiente para fracción ósea recuperada.

Además, la figura 1 muestra, junto con la descripción de la planta, una realización del procedimiento de la invención, en la que las designaciones representan las siguientes corrientes:

40 A3 = Corriente que incluye proteínas, enzimas, aceite/grasa, péptidos y aminoácidos libres. Tras la unidad de reducción de microorganismos 308, la corriente no contiene ninguna partícula sólida y tiene una proporción considerablemente reducida de proteínas no hidrolizadas y grasa si se han usado las unidades de separación 302 y

302;

A31 = Corriente si se usa la unidad de separación 302; tras la unidad 302, la corriente ya no contiene partículas sólidas;

A32 = Corriente si no se usa la unidad de separación 303;

5 B31 = Corriente que incluye sólidos eliminados usando un tamiz;

B32 = Corriente que incluye sólidos separados usando una centrífuga;

C3 = Corriente que incluye aceite/grasa;

D3 = Corriente de destilado o similar para liberar el permeado del filtro de membrana 309;

E3 = Corriente de disolución de péptido-aminoácido concentrada a la unidad de secado;

10 E31 = Corriente de disolución de péptido-aminoácido concentrada para envasarse como producto líquido;

F3 = Corriente de materiales de partida al fermentador 301;

F31 = Corriente de materiales de partida cuando la separación de aceite no tiene lugar antes de la hidrólisis;

G3 = Corriente de proteínas no hidrolizadas que vuelven a la corriente A3;

H3 = Corriente de agua añadida;

15 I3 = Corriente de aceite recuperado antes de la etapa de hidrólisis.

A menos que se indique otra cosa, todas descripciones en porcentaje se facilitan como porcentajes en peso.

A continuación se describe el procedimiento en más detalle:

#### 1) Materiales de partida:

20 Los materiales de partida para el procedimiento pueden consistir en materiales proteicos, preferiblemente pescado, productos de pescado, marisco, crustáceos, moluscos y subproductos de pescado o de la industria pesquera, por ejemplo, despojos de pescado y otros organismos marinos procedentes de agua dulce y agua salada. Los diversos materiales de partida pueden usarse individualmente o en una combinación de productos que contienen "material enzimático" y "material proteico". El "material enzimático" es el material de partida que contiene las enzimas endógenas en cantidad satisfactoria y de calidad satisfactoria. El "material proteico" describe materiales de partida  
25 que no contienen las enzimas endógenas en cantidad satisfactoria y de calidad satisfactoria, y que por tanto deben complementarse con el material enzimático para poder llevar a cabo el tratamiento enzimático. En algunos casos, el material enzimático puede ser idéntico al material proteico. Los procedimientos de la técnica anterior describen una combinación de despojos y material proteico en la razón 1:1. El método descrito en esta solicitud posibilita variar la razón para obtener el resultado deseado en el producto final.

30 Los materiales de partida cumplen los requisitos legales para los productos de partida para la producción de alimentos. Anteriormente, los materiales de partida se han clasificado como sobras por la legislación y las definiciones. A través de buenas rutinas logísticas y de procedimiento, será posible en este caso obtener la aprobación del material de partida como producto alimenticio. Esto facilita la producción a escala industrial y el uso del producto en el procesamiento de alimentos y/o la industria farmacéutica.

#### 35 2) Procesamiento previo de los materiales de partida:

Los materiales de partida se bombean desde un tanque, a través de un sistema de molienda 312 que produce la trituración deseada de los materiales. La molienda produce una superficie de trabajo mayor para las enzimas y libera las enzimas de los materiales de partida.

40 Un primer aceite/una primera grasa procedente de los materiales de partida puede recuperarse antes de iniciar el proceso enzimático. Aquí, por ejemplo, podría usarse una recuperación en frío del aceite.

La recuperación en frío de aceite puede llevarse a cabo:

1. centrifugando 313 los materiales de partida y separando partículas líquidas y sólidas en dos fracciones diferentes;

2. separando el aceite de la fase líquida, véanse 314 y 315;

45 3. mezclando la fase sólida y la fase pesada procedentes de la etapa de separación y bombeándolas al fermentador 301;

4. procesando adicionalmente la fase de aceite procedente de la etapa de separación para dar un producto específico del cliente terminado que no requiere refinado adicional para lograr calidad como producto alimenticio.

5 Los materiales de partida que se añaden al fermentador 301 pueden almacenarse en uno o más tanques intermedios después de la molienda. Pueden usarse tanques diferentes para el material proteico y el material enzimático.

Los materiales pueden bombearse a través del intercambiador de calor 316 hasta el tanque de fermentación 301. El tanque de fermentación 301 también puede usarse para calentar si esto no se realiza en un intercambiador de calor antes de bombearse los materiales a su interior.

10 La monitorización de las condiciones en el fermentador 301 se realiza de manera continua, o bien automáticamente o bien mediante toma de muestras manual. Se realiza la adición de diversos aditivos de modo que se mantengan las condiciones para el tratamiento con enzimas lo más constantes posible dentro del intervalo que es óptimo para el producto que va a producirse.

3) Proceso de tratamiento con enzimas:

15 Se bombean materiales de partida calentados o materiales de partida no calentados en forma de materiales proteicos y materiales enzimáticos al interior de uno o más tanques de tratamiento con enzimas. Se añade a esta mezcla agua calentada y con pH ajustado que tiene aproximadamente la temperatura a la que tendrá lugar la fermentación. La cantidad de agua puede variarse según el material de partida y el resultado deseado, dependiendo de la optimización de material enzimático y proteico disponible. El pH se ajusta mediante la adición de, por ejemplo, gas nitrógeno o harina de huesos.

20 La mezcla calentada y con pH ajustado de material de partida F3 y agua H3 se denominará a continuación en el presente documento "hidrolizado". El hidrolizado se mantiene en el tanque fermentador 301, opcionalmente bajo agitación constante y vigorosa. El objetivo de esto es potenciar el procedimiento de tratamiento con enzimas. El hidrolizado se bombea de manera continua a través del sistema para eliminar aminoácidos y péptidos.

25 Para mantener constantes las condiciones para el tratamiento con enzimas en el tanque de fermentación 301, se comprueban regularmente el contenido en nitrógeno asociado al grupo amino, proteínas totales y el pH.

El material proteico y el material enzimático se añaden según se requiere a lo largo de la duración deseada del procedimiento.

30 Un prerrequisito del procedimiento es que las enzimas alcalinas estén en funcionamiento. Por tanto, es esencial que el pH > 7,00 durante el tratamiento con enzimas. El intervalo de pH estará entre 7,00 y 8,50. Un procedimiento de tratamiento con enzimas óptimo se obtiene a un pH de 7,60 a 8,20. Si el pH > 8,1, pero < 8,4 durante la totalidad del procedimiento, el triptófano libre se excluye del espectro de aminoácidos. A la inversa, si el pH < 7,6, pero > 7,4 durante la totalidad del procedimiento, el triptófano se maximiza hasta el total que es posible recuperar, que se determina por el material de partida. Si la temperatura es < 46°C pero > 44°C y el pH es < 7,8 pero > 7,7 durante la totalidad del proceso, el colágeno no se disuelve en gran medida, sino que se obtiene en forma de partículas sólidas.

35 Pueden usarse diferentes bases, tales como harina de huesos procedente de producción anterior, calcio y nitrógeno, véanse 319 y 320, para el ajuste del pH del hidrolizado.

Por medio de la presente invención según el aspecto c) de la misma, es posible controlar continuamente el procedimiento de tratamiento con enzimas usando diferentes parámetros para mantener las condiciones a nivel óptimo.

40 Al final del procedimiento, debe terminarse la actividad enzimática mediante la inactivación por temperatura o de algún otro modo para evitar la amonificación.

4) Control de crecimiento de microorganismos:

45 La técnica anterior describe el cloroformo como aditivo para evitar el crecimiento de microorganismos, pero preferiblemente no se usa en este procedimiento. En el método según la invención, se usa UV u otro método adecuado que no coagula las enzimas para destruir bacterias y hongos. Esto se realiza para evitar que un crecimiento sustancial de microorganismos consuma los aminoácidos libres y los péptidos cortos liberados en la formación de nuevas proteínas. Además, no se prefiere el cloroformo a escala industrial.

5) Eliminación de partículas sólidas:

50 La invención implica que pueden eliminarse partículas sólidas, por encima de un determinado tamaño, a partir del hidrolizado o bien de manera continua o bien de manera periódica por medio un sistema de tamiz/filtro. El sistema de tamiz 302 puede omitirse o evitarse del sistema si el sistema de decantador 303 en la siguiente fase de producción se encarga de toda la eliminación de fase sólida, o si el producto A3 que se está procesando en la

presente situación, no contiene partículas sólidas que son adecuadas para su tamizado.

Entonces pueden separarse las partículas eliminadas B32 según la densidad a través de un proceso de flotación 304 de modo que pueden alimentarse los residuos de proteínas G3 de nuevo al tanque de fermentación 301. Las proteínas salen a flote y pueden retirarse o bien de manera mecánica o bien de manera manual. El material más pesado acaba en el fondo del tanque de flotación.

#### 6) Decantación del hidrolizado:

Puede usarse un decantador 303 en el sistema antes del separador de aceite 305 y el filtro de membrana 309. Esto se realiza para simplificar la separación de grasa del hidrolizado en, por ejemplo, un separador de tres fases y reducir de ese modo la tensión en el filtro de membrana posterior.

Un separador no funciona de manera óptima si el contenido en partículas sólidas es demasiado alto, lo que significa que la fase de sedimentación es grande. El decantador es una máquina construida para separar partículas sólidas de una densidad mayor que el líquido del que forman parte. En la invención, son principalmente proteínas que se separan y por tanto es deseable hacerlas pasar de nuevo al tanque de fermentación para el tratamiento con enzimas adicional. El material sólido separado puede hacerse flotar según el mismo principio que se usó en el sistema de tamizado. Puede usarse el mismo dispositivo de flotación, si se desea. El decantador 303 puede omitirse o desconectarse del sistema si el dispositivo de tamiz que ya se ha mencionado se encarga de la separación deseada o si los productos que están tratándose no producen residuos de proteínas que puedan eliminarse usando un decantador.

#### 7) Separación:

El hidrolizado se separa usando un separador de tres fases 305 u otro método de centrifugación adecuado que es adecuado para separar la fracción de grasa más ligera del hidrolizado. La separación de grasa tiene lugar o bien de manera continua o bien de manera periódica dependiendo de la cantidad de grasa en los materiales de partida que se están procesando. Una característica particularmente importante de la presente invención es que puede recuperarse una fracción de grasa muy pura y de alta calidad porque la separación puede realizarse de manera continua a lo largo del procedimiento, de modo que la grasa liberada no se somete a oxidación más tiempo del necesario cuando las lipoproteínas se descomponen por la hidrólisis. Que la hidrólisis tenga lugar en condiciones alcalinas también ayuda a mantener alta la calidad de la grasa, especialmente cuando se usa nitrógeno para el ajuste del pH.

#### 8) Filtración de membrana:

La invención implica que el hidrolizado se bombea a través de un dispositivo equipado preferiblemente con un filtro de membrana 309 que funciona de manera que permite que las moléculas de un determinado tamaño penetren en las membranas, preferiblemente inferiores a 10.000 daltons. La filtración se realiza de modo que el hidrolizado o bien se bombea a través de una pluralidad de membranas tubulares o bien se hace pasar a una pluralidad de membranas planas.

Se usa el principio de ósmosis para transportar a través de las membranas. La concentración de los aminoácidos libres y péptidos no filtrados produce agua destilada como subproducto y una parte de esto se alimenta de nuevo al filtro aproximadamente a la misma presión que el hidrolizado en el otro lado de la membrana. Manteniendo la concentración de aminoácidos y péptidos inferior en el lado de permeado de las membranas, se mantendrá una penetración conducida por ósmosis a través de ellas. El flujo de hidrolizado a lo largo de las membranas las limpia mecánicamente de depósitos de residuos de proteínas y péptidos que son mayores que los que pueden penetrar en las membranas.

#### 9) Concentración:

El filtrado de hidrolizado terminado debe concentrarse entonces. Esto se realiza para eliminar agua antes del proceso de secado de modo que se utiliza la capacidad de la etapa de secado en su totalidad, o de modo que se obtiene el nivel de concentración de aminoácidos y péptidos entrantes deseados en un producto líquido.

Un proceso de destilación del tipo de evaporación a vacío es muy adecuado para este fin, pero puede usarse cualquier otra forma de dispositivos de concentración para eliminar los péptidos y aminoácidos deseados del líquido en que están disueltos durante la filtración de membrana. El evaporador de vacío 310 concentra el líquido a baja temperatura, de modo que los péptidos/aminoácidos no resultan dañados. Un prerrequisito para que la función de la filtración de membrana en fases anteriores sea óptima es que el dispositivo de concentración 310 pueda devolver un destilado que sea lo más puro posible. Por tanto, la ósmosis a través de las membranas será óptima. La evaporación puede tener lugar en el intervalo de temperatura de +50 - +85°C. De manera óptima, este intervalo será de +65 - +70°C. Puede haber un riesgo de que el condensado tenga una temperatura que sea demasiado alta para hacerse pasar de nuevo de nuevo al filtro o al tanque de fermentación. Si este es el caso, debe usarse un intercambiador de calor que reduzca la temperatura hasta el nivel deseado.

## 10) Secado:

Tras la concentración, el producto puede secarse si así se desea, pero también puede estar en forma de un producto líquido o en cualquier forma entremedias. El secado, véase 311, hace que el producto sea más estable en almacenamiento y simplifica la logística y el manejo. La forma en que se seca el producto es importante para el resultado final. Un producto de péptido/aminoácido preparado podría ser altamente higroscópico y por tanto supone un reto en lo que se refiere a este procedimiento. Una alta temperatura en el proceso de secado también dará lugar a que el producto sea de carácter más higroscópico.

El secado/granulación tendrá lugar en dos fases. En primer lugar, el producto se seca hasta un polvo en un pulverizador o similar, con una etapa de enfriamiento y luego el producto se granula. La granulación se efectúa porque los granulados se “construyen” manteniendo el polvo/producto en movimiento vigoroso por medio de fluidización mecánica. Entonces, el material concentrado/hidrolizado se pulveriza dando lugar a esta masa y el granulado se acumula gradualmente. Todo esto tiene lugar en un proceso continuo. Al final del proceso de granulación, se sopla aire frío seco a través/por el granulado. Esto da como resultado que se endurezca y sea más fácilmente soluble. Entonces se tamiza el granulado y se extrae la fracción deseada. Las partículas que son demasiado pequeñas (finos) se hacen pasar de nuevo para granulación adicional, mientras que las partículas “con tamaño excesivo” se muelen y se tamizan de nuevo. Cualquier fino recién formado pasa de nuevo para una nueva granulación.

También podría usarse secado por pulverización convencional ordinario, pero esto da lugar a un polvo fino con una gran superficie. Esto significa que el producto se comporta de manera altamente higroscópica y por tanto resulta difícil de manejar en envases grandes, almacenamiento, etc.

Pueden añadirse diversos aditivos al producto durante el proceso de granulación. También pueden producirse productos que no se granulan, como pueden ser productos que no se secan sino que simplemente se concentran hasta el nivel deseado.

**Descripción detallada de la función del filtro de membrana:**

El filtro 309 puede estar constituido de elementos de filtro planos o tubulares. El sistema de filtro está constituido de modo que el filtrado, que consiste en hidrolizado de proteínas procedente del fermentador del que se han eliminado las partículas sólidas y la grasa, pero que incluye un complejo enzimático, puede circular libremente hasta pasar el lado de material retenido de las membranas (filtración de flujo cruzado). Por tanto, se genera un flujo a lo largo de la superficie de las membranas lo que minimiza mecánicamente el riesgo de formación de una torta de filtro bloqueante del material retenido depositado sobre las membranas. El filtrado que circula sobre el lado de material retenido de las membranas de filtro contiene enzimas que descomponen las proteínas y los péptidos grandes que llegan a depositarse sobre y en las membranas, pero que son demasiado grandes para penetrar en las membranas al lado del permeado. Se evita que las enzimas penetren en las membranas si la elección de membrana se realiza de modo que el tamaño de molécula máximo del permeado sea de 9.800 daltons. Por tanto, se bloquean las proteínas no descompuestas y se obtiene un producto estéril libre de proteínas.

La elección de una membrana con bloqueo de moléculas más pequeñas dará como resultado un producto que tiene péptidos más pequeños y un porcentaje superior de aminoácidos libres.

En el lado del permeado, se hace pasar una corriente de agua preferiblemente a lo largo de las membranas, correspondiente a la de en el lado del permeado. La presión puede ser igual en ambos lados de las membranas, dirigiendo la ósmosis el permeado a través de las membranas. La disolución tiene lugar en el líquido que circula en el lado del permeado.

El requisito para que la ósmosis funcione es que la concentración de aminoácidos y péptidos sea superior en el lado de material retenido de las membranas. Esto se logra haciendo que el destilado procedente de la planta de concentración sea el líquido que se hace circular en el lado del permeado de la membrana. En principio, esto puede describirse como diafiltración inversa que se realiza en el lado del permeado en que se usa aditivo de agua pura.

La concentración del permeado puede realizarse usando otro filtro de membrana dispuesto para ósmosis inversa (RO). La función del filtro de membrana será la misma.

Pueden usarse una serie de filtros para separar las diferentes fracciones, con respecto al tamaño de péptido máximo, pero en los filtros subsiguientes no hay ayuda del complejo enzimático para mantener las membranas de filtro libres de torta de filtro en el lado de material retenido. Puede resultar ventajoso filtrar en una fase para evitar el bloqueo.

Valores que se han obtenido en pruebas de laboratorio usando una membrana de diálisis de tipo de manguito convencional usada en área de hospital producida por el fabricante Spectrum Laboratories:

En las pruebas, se usó celulosa regenerada (RC) Spectra/Por 1 con punto de corte de peso molecular (MWCO) de 6.000 a 8.000 Daltons (de 6k a 8k MWCO). El flujo a través de estas membranas con un total de DM (materia seca)

## ES 2 444 215 T3

5 sobre el lado de material retenido del 14,7% a una temperatura de 48,7°C y un pH de 7,85 fue de 3,7 ml/cm<sup>2</sup>/h al inicio. Tras 12 horas, fue de 3,8 ml/cm<sup>2</sup>/h y tras 24 horas fue de 3,8 ml/cm<sup>2</sup>/h. No pudo registrarse bloqueo ni siguió a las 60 horas de tiempo de funcionamiento. No pudieron identificarse moléculas de más de 9.000 daltons en el permeado, con análisis del tamaño de péptidos antes y después de la concentración del total de 23 litros de líquido produciéndose un 36% de DM durante el total de 60 horas. El pico más grande en el espectrograma fue de 410-1350 daltons que sin corrección dio un 42% del área del espectrograma.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para recuperar péptidos/aminoácidos y aceite/grasa a partir de un material de partida que contiene proteínas, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
  - a. moler los materiales de partida;
  - 5 b. calentar los materiales de partida molidos hasta temperaturas en el intervalo de 40-62°C, preferiblemente 45-58°C;
  - d. añadir agua que tiene aproximadamente la misma o la misma temperatura que los materiales de partida, y en el que se ajusta el pH del agua añadiendo calcio;
  - e. hidrolizar los materiales de partida con enzimas endógenas para preparar un hidrolizado;
  - 10 g. eliminar las partículas sólidas y proteínas no hidrolizadas que pueden devolverse a la hidrólisis del hidrolizado;
  - h. separar de manera periódica o continua grasa/aceite para obtener un segundo producto de aceite;
  - j. separar la fracción de peso molecular de péptidos/aminoácidos deseada mediante filtración de membrana, preferiblemente de tipo de flujo cruzado;
  - 15 k. enviar las porciones del hidrolizado que no penetran en el filtro de membrana en el punto j de nuevo a la hidrólisis en la etapa e;
  - l. concentrar y opcionalmente secar el permeado para obtener péptidos/aminoácidos; y
  - m. devolver completa o parcialmente el destilado procedente de la concentración al lado del permeado del filtro de membrana.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que se añade un regulador de pH durante la hidrólisis en la etapa e para mantener el valor de pH deseado del hidrolizado.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que el hidrolizado se trata contra el crecimiento de microorganismos, preferiblemente con tratamiento UV.
4. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que se separa aceite/grasa de los materiales de partida antes y/o después de la etapa b para obtener un primer producto de aceite.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que tiene lugar como un procedimiento cerrado.
6. Método según la reivindicación 2, caracterizado por que el regulador de pH es gas nitrógeno o harina de huesos.
7. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende además dividir las partículas sólidas procedentes de la etapa g en hidroxiapatita, residuos de proteínas y otras partículas sólidas.
- 30 8. Método para la hidrólisis de uno o más materiales de partida que contienen proteínas y la separación de aminoácidos/péptidos, caracterizado por que la hidrólisis se lleva a cabo usando las enzimas endógenas del material o materiales que contienen proteínas; y porque el hidrolizado se hace pasar a través de un filtro de tipo membrana, en el que los péptidos/aminoácidos siguen una corriente de permeado, mientras que las enzimas activas descomponen de manera continua cualquier residuo de proteínas que se deposite sobre la superficie de la membrana y las enzimas se hacen pasar junto con el material retenido de nuevo a la hidrólisis.
- 35

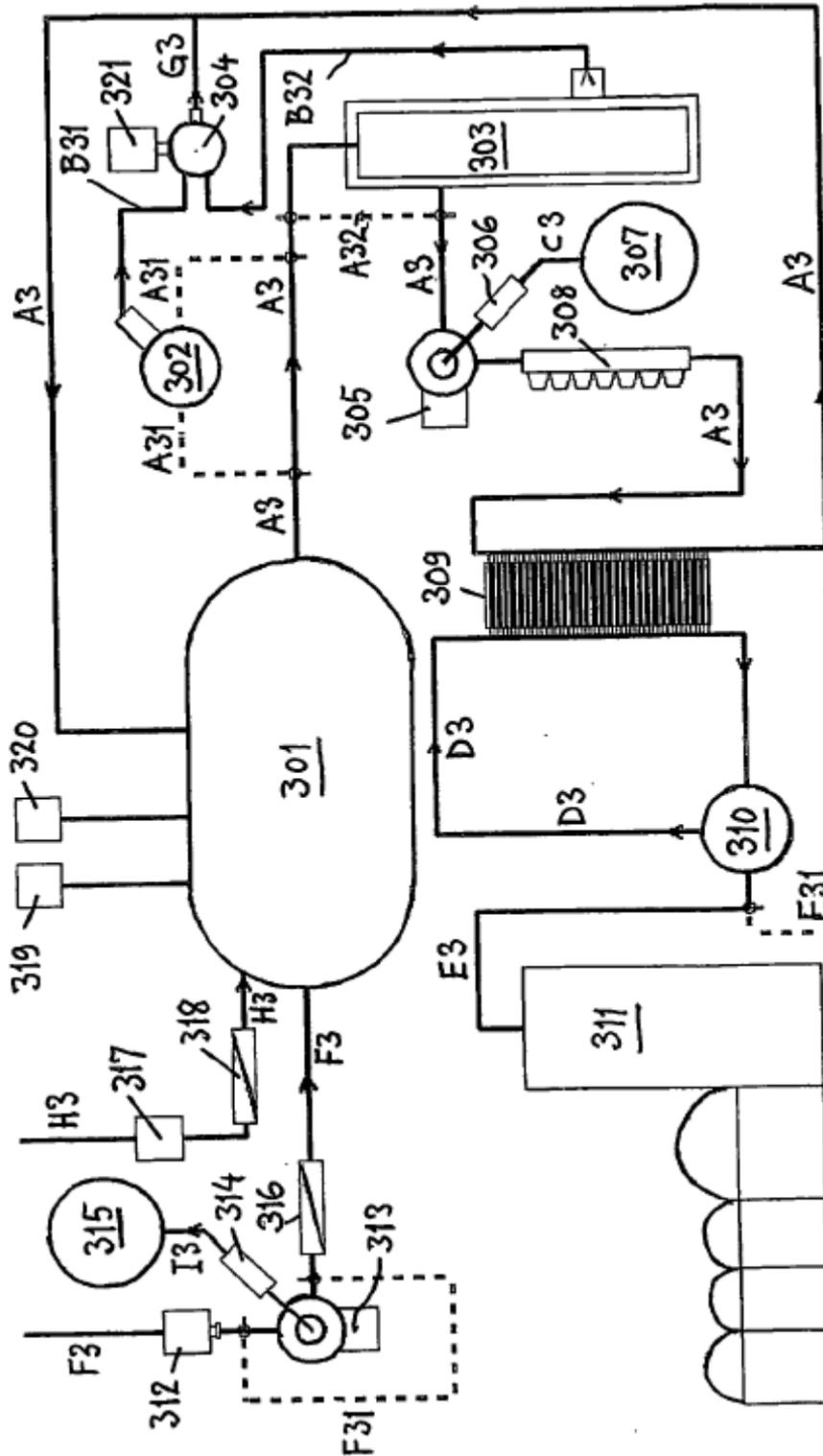


Fig. 1