

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 665 773**

51 Int. Cl.:

A23J 3/34 (2006.01)

A23J 1/12 (2006.01)

A23L 33/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2013 PCT/EP2013/071914**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064024**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2013 E 13779581 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018 EP 2908657**

54 Título: **Hidrólisis suave de proteínas de salvado de arroz**

30 Prioridad:

22.10.2012 EP 12189395

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

27.04.2018

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon, 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**JANSE, ARTHUR MAURITS CHRISTIAAN;
VEERMAN, CECILE y
SMOLDERS, GERARDUS JOHANNES
FRANCISCUS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 665 773 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

Hidrólisis suave de proteínas de salvado de arroz

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un proceso para extraer proteínas suavemente de salvado de arroz por proteólisis limitada.

Antecedentes de la invención

10 La extracción de proteína de fuentes agrícolas puede ser obstaculizada por la solubilidad de las propias proteínas o sus interacciones en la matriz con otros constituyentes. La solubilidad está a su vez influida por las etapas de procesamiento antes de la recogida de la proteína. Por ejemplo, el desengrasado del material disminuye la solubilidad de las proteínas drásticamente. Por tanto, se aplica la técnica de la proteólisis para aumentar la solubilidad de las proteínas y así el rendimiento de extracción de proteína. El uso de enzimas proteolíticas produce principalmente un producto de sabor amargo debido a un alto grado de hidrólisis con aplicaciones limitadas en alimentos.

15 El salvado de arroz es un subproducto del proceso de molienda del arroz. Generalmente, la molienda del arroz da aproximadamente 15 % en peso de granos rotos, aproximadamente 10 % en peso de salvado de arroz, aproximadamente 20 % en peso de cáscaras y aproximadamente 55 % en peso de granos enteros. El contenido típico de proteína del salvado de arroz es aproximadamente del 14 % en peso. Otros componentes en el salvado de arroz son humedad (aproximadamente 10 % en peso), aceite en bruto (aproximadamente 20 % en peso), fibra dietética total (aproximadamente 18 % en peso), almidón (aproximadamente 22 % en peso), ceniza (aproximadamente 8 % en peso) y otros componentes (aproximadamente 8 % en peso). Un producto valioso obtenido del salvado de arroz es el aceite de salvado de arroz que es el aceite extraído del germen y la capa de salvado. Después de la eliminación del aceite, queda un producto desengrasado que normalmente se usa en aplicaciones para pienso. El contenido de grasa del salvado de arroz desengrasado es inferior al 5 % en peso. Se estima que anualmente se producen más de 70 millones de toneladas de salvado de arroz, que todavía contienen varios componentes valiosos, como proteínas.

20 La extracción de proteínas del salvado de arroz ha sido publicada en la bibliografía. Los métodos de extracción incluyen el uso de agua en condiciones alcalinas y/o el uso de varias carbohidrasas (como amilasas) algunas veces en combinación con la enzima fitasa. Se sabe que la extracción de proteínas del salvado de arroz tratado es difícil. Sin embargo, en caso de salvado de arroz desengrasado, la extracción de proteína es incluso una tarea más rigurosa debido al tratamiento térmico durante la extracción de aceite y especialmente durante el proceso de tostado para eliminar el hexano residual con desnaturalización de la proteína como consecuencia.

Sumario de la invención

35 La presente invención proporciona un hidrolizado de salvado de arroz desengrasado que comprende más del 90 %, preferentemente más del 95 %, de (poli)péptidos con un peso molecular (MW) superior a 500 Da y que tiene un GH (grado de hidrólisis) entre el 10 y el 16 %, y que tiene un contenido de proteína entre el 30 % en peso y el 45 % en peso, preferentemente entre el 33 % en peso y el 45 % en peso, más preferentemente entre el 34 % en peso y el 45 % en peso, lo más preferentemente entre el 35 % en peso y el 45 % en peso en materia seca y que tiene una distribución de peso molecular (MW) de los (poli)péptidos presentes:

MW > 100000:	10 al 30 % en peso;
100000 > MW > 30000:	10 al 30 % en peso;
30000 > MW > 3000	10 al 30 % en peso
3000 > MW > 500:	40 al 60 % en peso;
MW < 500:	inferior al 5 % en peso.

40 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un proceso para producir un hidrolizado de salvado de arroz que comprende

- añadir una enzima o composición de enzima a una suspensión de salvado de arroz desengrasado que tiene una concentración de salvado de arroz de entre el 12 y el 30 % en peso;
- realizar una incubación con enzima a un pH entre 6 y 8;
- realizar la incubación con enzima a un grado de hidrólisis de entre un GH (grado de hidrólisis) del 10 y el 16 %;

- realizar la incubación con enzima a una temperatura de entre 45 y 65 °C; y
- separar el líquido de la fracción sólida;

por el cual la enzima o composición de enzima comprende una metalo-endoproteasa.

Leyenda de la figura

5 Fig. 1: SDS-PAGE de hidrolizados producidos con Maxazyme® NNP DS y Collupuline® 200L, junto con sus líquidos de enzima aplicados

Carril 1: Patrón (referencia)

Carril 2: Maxazyme NNP DS®

Carril 3: Hidrolizado de Maxazyme NNP DS®

10 Carril 4: Hidrolizado de Collupuline 200L®

Carril 5: Collupuline 200L®

Maxazyme NNP DS es un producto de DSM y es una metaloproteasa. Collupuline 200L es un producto de DSM y es papaína.

Descripción detallada de la invención

15 En toda la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las palabras "comprender" e "incluir" y variaciones tales como "comprende", "que comprende", "incluye" y "que incluye" deben interpretarse de forma inclusiva. Es decir, estas palabras pretenden expresar la posible inclusión de otros elementos o números enteros no específicamente citados, donde lo permita el contexto.

20 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" puede significar un elemento o más de un elemento.

En la presente invención, las proteasas se aplican bajo condiciones tales que se forma un hidrolizado con una distribución de peso molecular única. Esto produce un perfil sensorial mejorado en comparación con la metodología convencional y el campo de aplicación de estos hidrolizados es mucho más amplio.

25 Esta técnica de hidrólisis suave se aplica preferentemente a salvado de arroz desengrasado. Sin embargo, el proceso descrito es válido también para otras fuentes de salvado de arroz tales como salvado de arroz crudo y salvado de arroz estabilizado con calor.

30 Para valorizar el salvado de arroz desengrasado u otro material agrícola, se proporciona un proceso basado en una hidrólisis limitada o suave, seguida preferentemente de una separación sólido/líquido. Tanto la corriente líquida como la insoluble pueden ser adicionalmente secadas. Una ventaja de este tratamiento con proteasa, seguido de separación, es que se obtiene una fracción sólida (sedimento) con una alta cantidad de fibra dietética total que también puede usarse en diversas aplicaciones para alimentos.

35 Por salvado de arroz se indica la capa externa dura del arroz que consiste en aleurona y pericarpio combinados. Junto con el germen, es una parte integral del arroz entero y frecuentemente se produce como un subproducto de la molienda en la producción de arroz refinado. El salvado de arroz crudo es salvado de arroz como se obtuvo después de la molienda. Por salvado de arroz desengrasado se indica salvado de arroz del que al menos parte del aceite presente se elimina por, por ejemplo, extracción. La extracción de aceite se realiza, por ejemplo, con hexano a aproximadamente 60-65 grados Celsius mientras que el tostado para la eliminación del hexano normalmente se realiza a 110 grados Celsius. Por salvado de arroz estabilizado se indica salvado de arroz que después de la

40 molienda se estabiliza a 130 grados Celsius durante < 10 segundos.

45 La hidrólisis para extraer proteínas de diversas fuentes agrícolas es un proceso muy conocido. Para salvado de arroz, existen varios estudios para obtener la fracción de proteína usando enzimas, además de las técnicas de extracción alcalinas más ampliamente aplicadas, véase, por ejemplo, el documento US20110305817. El uso de proteasas es generalmente más satisfactorio en comparación con el uso de carbohidrasas (véase, por ejemplo, la revisión de Fabian y Ju (A Review on rice bran protein: its properties and extraction methods, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2011, vol. 51, 816-827) que resume los métodos enzimáticos). Han sido investigadas varias proteasas en la bibliografía para obtener rendimientos de extracción de proteína más altos (en comparación con carbohidrasas). Estos productos de hidrólisis son normalmente hidrolizados de sabor amargo que no pueden ser ampliamente aplicados en alimentos.

N. Hernandez et al. (Enzymatic treatment of rice bran to improve processing, 2000, Journal of the American oil chemists society, volumen 77, no. 2, páginas 177-180) describen reacciones enzimáticas que implican salvado de arroz. El salvado de arroz crudo fue primero tratado con calor para desactivar la lipasa, pero también para gelatinizar el almidón previo a la reacción con alfa-amilasa. Después de una separación sólido-líquido, el sobrenadante sigue una etapa de sacarificación con glucoamilasa para producir glucosa. El salvado residual es posteriormente sometido a un proceso proteolítico para la extracción de proteína o se trata directamente con un disolvente para obtener aceite de salvado. Aunque Hernandez et al. empiezan a partir de un arroz crudo, puede decirse que debido al tratamiento con calor, el material de partida para la proteólisis es comparable a salvado de arroz estabilizado. Los inventores de la presente solicitud han producido datos experimentales (no desvelados en el presente documento) en los que el salvado de arroz estabilizado se trató con Maxazyme NNP DS que produjo repetidamente bajos rendimientos de extracción (aproximadamente del 15 %) y bajo contenido de proteína (aproximadamente del 15-19 %). El contenido de proteína no aumentó tras el aumento del tiempo de incubación con enzima. Se llega, por tanto, a la conclusión por los presentes inventores que realizar la proteólisis en salvado de arroz estabilizado siempre produce bajo contenido de proteína. Como consecuencia, el hidrolizado de proteína como se produjo por Hernandez et al. se considera que es bajo en contenido de proteína.

El documento US 2011/0152180 describe pentapéptidos bioactivos de salvado de arroz. Se describe en el párrafo [0053] que el salvado de arroz desengrasado estabilizado con calor se trató con Alcalase en condiciones optimizadas. Los inventores de la presente invención tienen evidencia experimental (no incluida en el presente documento) de que Alcalase es una enzima muy activa y conduce a una fuerte degradación de proteína cuando se incuba con diferentes fuentes de salvado de arroz. Como resultado, el tratamiento de salvado de arroz con Alcalase no produce la distribución de peso molecular de (poli) péptidos que se reivindica en el presente documento. Según el Ejemplo 1 del documento US 2011/0152180, el grado de hidrólisis es del 23,4 %, que está fuera del alcance del intervalo preferido reivindicado de entre el 10 y el 16 %.

P. Hanmoungjai et al. (Enzyme-assisted water-extraction of oil and protein from rice bran, Journal of chemical technology and biotechnology, volumen 77, no. 7, 2002, página 771-776) describen el uso de Alcalase y papaína para extraer proteínas y aceite de salvado de arroz. Los inventores de la presente invención tienen evidencia experimental de que el uso de Alcalase y papaína para la hidrólisis del salvado de arroz produce una distribución de peso molecular de los (poli) péptidos resultantes que es diferente en comparación con la que se reivindica en el presente documento.

Hamada, J. of Food Biochemistry, vol. 23, no. 3, 1999, p. 307 - 321, desvela el uso de proteasas para potenciar la solubilización de proteínas del salvado de arroz. El salvado de arroz desengrasado se hidroliza con endoproteasas a diferentes grados de hidrólisis. Dicho documento identifica una necesidad de identificar la hidrólisis del enlace peptídico óptimo de la proteína de arroz para evitar la formación de péptido amargo.

Hamada, Journal of Food Science, vol. 65, 2000, p. 305 - 310, trata de la caracterización y propiedades funcionales de proteínas del salvado de arroz modificadas por exoproteasas y endoproteasas comerciales. Se encontró que Aromazyme TM (mezcla de endo- y exoproteasas) producía hidrolizados de salvado de arroz adecuados para aplicaciones para alimentos. Se había encontrado que dicha enzima era adecuada para quitar el amargor de hidrolizados de proteína amargos a bajos grados de hidrólisis. En la presente invención se usa una técnica de proteólisis suave para obtener hidrolizado de salvado de arroz con una distribución de peso molecular ventajosa. Sorprendentemente, el hidrolizado de arroz de la invención tiene un buen perfil de sabor que hace que este hidrolizado sea ampliamente aplicable en diversas aplicaciones para alimentos tales como bebidas, aplicaciones en panadería y lácteos.

La presente invención se refiere a un proceso para producir un hidrolizado de salvado de arroz que comprende

- añadir una enzima o composición de enzima a una suspensión de salvado de arroz desengrasado que tiene una concentración de salvado de arroz de entre el 12 y el 30 % en peso;
- realizar una incubación con enzima a un pH entre 6 y 8;
- realizar la incubación con enzima a un grado de hidrólisis de entre un GH (grado de hidrólisis) del 10 y el 16 %;
- realizar la incubación con enzima a una temperatura de entre 45 y 65 °C; y
- separar el líquido de la fracción sólida;

por el cual la enzima o composición de enzima comprende una metalo-endoproteasa.

Para un proceso interesante comercial para producir un hidrolizado de salvado de arroz, la cantidad de etapas debe ser tan pequeña como sea posible. En otra realización más, la invención proporciona un proceso para producir un hidrolizado de salvado de arroz que consiste en

- añadir una enzima o composición de enzima a una suspensión de salvado de arroz desengrasado que tiene una concentración de salvado de arroz de entre el 12 y el 30 % en peso;
- realizar una incubación con enzima a un pH entre 6 y 8;
- 5 - realizar la incubación con enzima a un grado de hidrólisis de entre un GH (grado de hidrólisis) del 10 y el 16 %;
- realizar la incubación con enzima a una temperatura de entre 45 y 65 °C; y
- separar el líquido de la fracción sólida;

por el cual la enzima o composición de enzima comprende una metalo-endoproteasa.

10 En todavía una realización adicional, la invención proporciona un proceso para producir un hidrolizado de salvado de arroz que consiste en

- añadir una enzima o composición de enzima a una suspensión de salvado de arroz desengrasado que tiene una concentración de salvado de arroz de entre el 12 y el 30 % en peso;
- realizar una incubación con enzima a un pH entre 6 y 8;
- 15 - realizar la incubación con enzima a un grado de hidrólisis de entre un GH (grado de hidrólisis) del 10 y el 16 %;
- realizar la incubación con enzima a una temperatura de entre 45 y 65 °C;
- separar el líquido de la fracción sólida; y
- un tratamiento con calor para inactivar la enzima usada

por el cual la enzima o composición de enzima comprende una metalo-endoproteasa.

20 Aunque el método de la invención puede realizarse a pequeña escala, se prefiere realizar el método reivindicado a gran escala que empieza con al menos 2 litros de suspensión, más preferentemente al menos 4 o 6 litros de suspensión y lo más preferido al menos 8 o 10 litros de suspensión.

25 La presente invención también se refiere a hidrolizado de salvado de arroz desengrasado que comprende más del 90 %, preferentemente más del 95 %, de (poli)péptidos con un peso molecular (MW) superior a 500 Da y que tiene un GH (grado de hidrólisis) entre el 10 y el 16 %, y que tiene un contenido de proteína entre el 30 % en peso y el 45 % en peso, preferentemente entre el 33 % en peso y el 45 % en peso, más preferentemente entre el 34 % en peso y el 45 % en peso, lo más preferentemente entre el 35 % en peso y el 45 % en peso en materia seca y que tiene una distribución de peso molecular (MW) de los (poli)péptidos presentes:

MW > 100000:	10 al 30 % en peso;
100000 > MW > 30000:	10 al 30 % en peso;
30000 > MW > 3000	10 al 30 % en peso
3000 > MW > 500:	40 al 60 % en peso;
MW < 500:	inferior al 5 % en peso.

30 Aparte de los (poli)péptidos, el hidrolizado de salvado de arroz puede comprender hidratos de carbono, grasa y minerales (determinados frecuentemente como fracción de ceniza). Incluso más preferentemente, la invención proporciona un hidrolizado de salvado de arroz desengrasado que comprende más del 90 %, preferentemente más del 95 %, de (poli)péptidos con un peso molecular (MW) superior a 500 Da y que tiene un GH (grado de hidrólisis) entre el 10 y el 16 %, y que tiene un contenido de proteína entre el 30 % en peso y el 45 % en peso, preferentemente entre el 33 % en peso y el 45 % en peso, más preferentemente entre el 34 % en peso y el 45 % en peso, lo más preferentemente entre el 35 % en peso y el 45 % en peso en materia seca y que tiene una distribución de peso molecular (MW) de los (poli)péptidos presentes:

MW > 100000:	10 al 30 % en peso;
100000 > MW > 30000:	10 al 30 % en peso;
30000 > MW > 3000	10 al 30 % en peso
3000 > MW > 500:	40 al 60 % en peso;

MW < 500:

inferior al 5 % en peso,

en el que dicho hidrolizado de proteína comprende además 40-60 % de hidratos de carbono y 0-5 % de grasa. Otras cantidades preferidas son 45-50 % de hidratos de carbono y 2-3 % de grasa.

Preferentemente, el hidrolizado de salvado de arroz es obtenible o se obtiene por el proceso de la presente invención. Preferentemente, el contenido de di- y tri-peptidos presentes en el hidrolizado de la invención es inferior al 5 % en peso. Preferentemente, el contenido de aminoácidos libres presentes en el hidrolizado de la invención es inferior al 2 % en peso. El salvado de arroz usado en el proceso de la invención es salvado de arroz desengrasado y el hidrolizado obtenido es un hidrolizado de salvado de arroz desengrasado.

En el presente documento, un "péptido" se define como una cadena de al menos dos aminoácidos que están unidos mediante enlaces peptídicos. Un "polipéptido" se define en el presente documento como una cadena que comprende más de 30 restos de aminoácidos e incluye proteína. Como se usa en el presente documento, un hidrolizado de proteína es una proteína que ha sido hidrolizada por la acción de una proteasa. Una proteasa es una enzima que hidroliza enlaces peptídicos entre aminoácidos. Una proteína consiste en uno o más polipéptidos, que consisten en aminoácidos unidos juntos por enlaces peptídicos. Un hidrolizado de proteína puede ser una proteína que ha sido hidrolizada a un grado de hidrólisis (GH) de entre el 5 y el 35 %, por ejemplo entre el 8 y el 25 % o entre el 10 y el 16 %, expresado como enlaces peptídicos escindidos/número total de enlaces peptídicos originalmente presentes x 100 %.

Un aspecto importante de la invención de los presentes inventores se refiere a que la fracción de proteína del salvado de arroz (desengrasado) es solo parcialmente hidrolizada. Esto se expresa en un grado de hidrólisis relativamente bajo de entre el 10 y el 16 %. Un grado de hidrólisis más alto comúnmente produce productos de sabor amargo, mientras que un grado de hidrólisis bajo produce bajos rendimientos de extracción de proteína. En la invención de los presentes inventores, los presentes inventores aplican un grado de hidrólisis que produce un producto de buen sabor y al mismo tiempo un rendimiento de extracción de proteína aceptable. Normalmente, el uso de Alcalase o papaína produce un grado de hidrólisis mucho más alto.

Enzimas, que incluyen proteasas, se clasifican en los esquemas internacionalmente reconocidos para la clasificación y nomenclatura de todas las enzimas de IUMB. El texto de IUMB actualizado para los números EC de proteasas puede encontrarse en el sitio de internet: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/index.html>. En este sistema, las enzimas se definen por el hecho de catalizar una única reacción. Esto tiene la importante implicación de que varias proteínas diferentes son todas descritas como la misma enzima, y una proteína que cataliza más de una reacción se trata como más de una enzima. El sistema clasifica las proteasas en endo- y exoproteasas. Las endoproteasas son aquellas enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos internos, las exoproteasas hidrolizan enlaces peptídicos adyacentes a un grupo α -amino terminal ("aminopeptidasas"), o un enlace peptídico entre el grupo carboxilo terminal y el penúltimo aminoácido ("carboxipeptidasas"). Las endoproteasas se dividen en sub-subclases basándose en el mecanismo catalítico. Hay sub-subclases de serina endoproteasas (EC 3.4.21), cisteína endoproteasas (EC 3.4.22), endoproteasas aspárticas (EC 3.4.23), metalo-endoproteasas (EC 3.4.24) y treonina endoproteasas (EC 3.4.25).

Una endoproteasa usada en el proceso de la invención para obtener un hidrolizado de proteína de salvado de arroz es ventajosamente una metalo-endoproteasa (EC. 3.4.24) tal como Neutrase®, Maxazyme NNP DS® (EC. 3.4.24.28; bacilolisina), una serina endoproteasa (EC 3.4.21) tal como Alcalase® o Protease P®, o una cisteína endopeptidasa (EC 3.4.22) tal como papaína o bromelaína. Preferentemente, la endoproteasa es una metalo-endoproteasa, más preferentemente una bacilolisina (EC 3.4.24.28). Preferentemente, el proceso de la invención usa una metalo-endoproteasa, tal como Maxazyme NNP DS. La neutrasa es algo menos preferida debido a la presencia de actividades secundarias de amilasa.

Opcionalmente, puede usarse una aminopeptidasa (EC 3.4.11) tal como Corolase LAP®, además de una endoproteasa para incluso optimizar adicionalmente el perfil de sabor del hidrolizado de proteína de salvado de arroz.

Como se ha mencionado antes, la concentración de salvado de arroz de la suspensión usada en el proceso de la invención es entre el 12 y el 30 % en peso. Preferentemente, la concentración de salvado de arroz es entre el 15 y el 25 % en peso, más preferentemente la concentración de salvado de arroz es entre el 15 y el 22 % en peso. En la bibliografía, concentraciones de salvado de arroz típicas son del 10 % en peso o menos. Sin embargo, aquellos valores bajos son difícilmente de relevancia industrial debido a las cantidades relativamente altas de agua que tienen que eliminarse en la obtención del producto final.

Como se ha mencionado antes, el pH de incubación usado en el proceso de la invención está entre 6 y 8. Preferentemente, el pH de incubación está entre 6,5 y 7,5. Incluso más preferentemente, el pH de incubación está entre 7 y 7,5.

El tiempo de incubación usado en el proceso de la invención es en general entre 1 y 6 horas. Preferentemente, la incubación es entre 1 y 4 horas. Incluso más preferentemente, el tiempo de incubación es entre 1 y 2 horas.

Como se ha mencionado antes, la temperatura de incubación es entre 45 y 65 °C. Preferentemente, la temperatura de incubación es entre 45 y 55 °C. Más preferentemente, la temperatura de incubación es entre 48 y 55 °C.

5 Según otro aspecto de la invención, el hidrolizado producido con el proceso de la invención se separa en un sólido y fracción líquida usando un separador sólido/líquido. La fase acuosa, disolución o fracción puede separarse de la fase sólida o fracción de cualquier modo conveniente, tal como empleando filtración y/o centrifugación. El líquido resultante y/o la fracción sólida pueden secarse de cualquier manera conveniente. El secado de la fracción soluble puede hacerse, por ejemplo, en una secadora por pulverización, secadora de tambor, entre otros tipos. La fracción sólida o de fibra puede secarse, por ejemplo, en la secadora de tambor, secadora de cinta y otro equipo que pueda manipular altas cargas de sólidos.

10 Después de la hidrólisis de la invención, la enzima o composición de enzima puede inactivarse. Por ejemplo, puede aplicarse un choque térmico.

15 El producto del proceso de la presente invención comprende en general un contenido de proteína entre el 35 % en peso y el 45 % en peso en materia seca. Otro contenido de proteínas preferido es entre el 30 % en peso y el 45 % en peso, preferentemente entre el 33 % en peso y el 45 % en peso, más preferentemente entre el 34 % en peso y el 45 % en peso, el más preferible entre el 35 % en peso y el 45 % en peso en materia seca. El grado de hidrólisis del hidrolizado de salvado de arroz es entre el 10 y el 16 %.

20 El hidrolizado de salvado de arroz de la invención tiene preferentemente una solubilidad de nitrógeno a pH 6,8 del 75 al 100 % de SN. El hidrolizado de proteína de salvado de arroz de la invención tiene preferentemente una capacidad de espumación de más de 200 ml, preferentemente 200 a 500 ml, y/o una estabilidad de espumación de más de 100 ml, preferentemente 100 a 200 ml.

Métodos y materiales

Materiales

25 El salvado de arroz desengrasado (SAD) está comercialmente disponible y puede obtenerse de salvado de arroz crudo extrayendo primero en hexano a temperaturas elevadas de 55-65 °C durante menos de 1 hora, seguido de una llamada etapa de tostado a 105-110 °C, para eliminar el hexano residual. La enzima Maxazyme NNP DS®, Collupuline 200L®, Brewers Clarex®, Fromase 750 TL® y Dexclo CL® son productos comerciales de DSM (Los Países Bajos).

Contenido de proteína

30 El contenido de proteína se determinó por el método de Kjeldahl según el método oficial de AOAC 991.20 Nitrógeno (total) en leche. Se usó un factor de conversión de 6,25 para determinar la cantidad de proteína (% (peso/peso)).

Contenido de hidrato de carbono:

35 Se cuantificaron los hidratos de carbono totales por una modificación del método de NREL (Laboratorio Nacional de Energías Renovables) NREL/TP-510-42618. A diferencia de este método, la detección, después de la hidrólisis, de los monosacáridos libres se logró por medio de RMN cuantitativa (QNMR) con ácido maleico como patrón interno. Se registraron los espectros de RMN en un sistema de RMN Bruker Avance III 600 MHz equipado con una criosonda de 5 mm. La temperatura de la sonda se estableció a 280 K (6,85 °C).

Contenido de grasa

El contenido de grasa se determinó según el método de AOCS 6ª edición, Ce 1-62

Contenido de ceniza total

40 El contenido de ceniza total según the Food Chemical Codex edición 7, General tests and assays, Apéndice II, C, página 1746.

SDS-PAGE

45 Los patrones del péptido se visualizaron por SDS-PAGE. Todos los materiales usados para SDS-PAGE y tinción se compraron de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Las muestras se prepararon usando tampón de SDS según las instrucciones del fabricante y se separaron en geles al 12 % de Bis-Tris usando el sistema tampón MES-SDS según instrucciones del fabricante. La tinción se realizó usando Simply Blue Safe Stain (Collodial Coomassie G250

Solubilidad de nitrógeno (% de SN)

50 Se prepararon disoluciones de proteína disolviendo polvo de proteína a una concentración de proteína del 2 % (peso/peso) en agua desmineralizada. El pH se ajustó a 4, 6,8 u 8,0 con HCl 4 M o NaOH 4 M (no se añadió sal adicional).

Se incubaron disoluciones durante 2 horas a 50 °C mientras que se agitaba vigorosamente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 20.000 g durante 5 min y se recogió el sobrenadante. Se analizó el contenido de proteína del sobrenadante y las muestras de polvo de proteína por el método de Kjeldahl. La solubilidad de nitrógeno (% de SN) se definió como:

$$5 \quad \% \text{ de SN} = \frac{\text{nitrógeno en el sobrenadante (mg)}}{\text{nitrógeno total en una muestra de 100 mg}} \times 100 \%$$

Capacidad y estabilidad de espumación

10 Se prepararon disoluciones de proteína disolviendo polvo de proteína a una concentración de proteína del 2 % (peso/peso) en agua desmineralizada. El pH se ajustó a 4, 6,8 u 8 con HCl 4 M o NaOH 4 M. La espuma se generó por batido vigoroso de 100 g de disolución de proteína durante 1 minuto (batidora Warning con 4 cuchillas giratorias a 18.000 rpm en un vaso de precipitados de 1 l). Después de la generación de espuma, el contenido de espuma/líquido se transfirió a probetas de 250 ml. Se determinó la capacidad de espumación de proteínas midiendo el volumen de la espuma 30 segundos después de preparar la espuma. La estabilidad de espumación se definió como el volumen de espuma 30 minutos después de la preparación de la espuma.

Contenido de materia seca

15 Se determinó el contenido de materia seca usando el método de infrarrojos a 105 °C.

Grado de hidrólisis

Se determinó el grado de hidrólisis con la prueba rápida de OPA (Nielsen, P.M., Petersen, D., Dambmann, C., Improved method for determining food protein degree of hydrolysis, Journal of Food Science 2001, 66, 642-646). El factor de Kjeldahl usado fue 6,25.

20 *Determinación del contenido de aminoácidos libres*

25 Se disolvieron muestras en una cantidad conocida de disolución 0,1 N de HCl. Se mezclaron 100 µl de esta disolución con una disolución de patrón interno (IS) que contenía análogos marcados con isótopo de los aminoácidos para corregir los efectos de la supresión iónica de los péptidos co-eluyentes. Se mezclaron 10 µl de esta muestra/disolución de IS con 70 µl de tampón borato de Waters y 20 µl de reactivo de derivatización de Waters. Después de mezclar, la disolución se calentó a 55 °C durante 10 minutos. Se inyectó 1 µl sobre el sistema de UPLC-EM/EM.

30 Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos de presión ultra-alta combinado con un espectrómetro de masas aXevo TQ de Waters. La columna fue una columna BEHC18 de Waters (150 x 2,1 mm, 1,7 µ) que operó a un flujo de 0,4 ml/min a 43 °C. Las móviles fueron de Waters diseñada como AccQ-Tag Eluent A y AccQ-Tag Eluent B. El gradiente se aplicó según la Tabla 1.

Tabla 1: Perfil de gradiente

Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)	Curva
0	99,9	0,1	
1,14	99,9	0,1	Lineal
2,00	98,5	1,5	Lineal
5,50	98,1	1,9	Lineal
6,50	98,0	2,0	Convexa
10,00	97,6	2,4	Lineal
12,00	96,0	4,0	Lineal
20,00	88,0	12,0	Lineal
35,00	85,0	15,0	Convexa
36,00	2,0	98,0	Lineal
38,00	2,0	98,0	Lineal

Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)	Curva
39,00	99,9	0,1	Lineal
60,00	99,9	0,1	

Se ionizaron los derivados de aminoácido en modo positivo usando ionización por electropulverización. La cantidad de aminoácidos libres se determinó mediante una curva de calibración externa que contenía aminoácidos y aminoácidos marcados con isótopo que se derivatizaron como se describió antes.

5 *Determinación de la cantidad de di y tri-péptidos*

La cantidad di y tri-péptidos se determinó según el siguiente método:

- Análisis con espectrometría de masas (EM) de una mezcla de una concentración conocida de 10 dipéptidos diferentes y 10 tripéptidos diferentes
- 10 - Análisis con EM de la muestra proporcionada: se centrifugó 1 ml de disolución de la muestra (2 mg/ml) sobre una columna de centrifugación de 3 kD y se analiza el filtrado.
- Análisis de un muestra de blanco (MQ)

La mezcla de di y tri-péptidos contuvo los siguientes péptidos:

Dipéptidos:

GC, AG, FG, GP, RW, WL, VP, KK, AA, FL

15 Tripéptidos:

WGP, GGP, YPP, LAL, LAV, EGP, LAK, LAW, VPL, NPI

(para los aminoácidos se usa la abreviatura de 1 letra).

20 El intervalo de masas del dipéptido más pequeño (GG) al tripéptido más grande (WWW) es de 133 - 575 Da. Usando este intervalo de masas, se determina el área de pico total de la muestra. Se restó el área de pico de la inyección de la muestra de blanco de la inyección de muestra para excluir los iones de fondo.

Determinación de la distribución de peso molecular

Se pesaron 200 mg de muestra de hidrolizado de salvado de arroz por duplicado en matraces volumétricos de 10 ml y se enrasaron con agua MQ. Esta suspensión se mezcló durante 30 min a temperatura ambiente a 900 rpm con un agitador magnético.

25 Posteriormente, se cargaron 500 µl de la suspensión en un filtro de 100 kDa de corte (Pall nanosep 100 k omega) y se centrifugaron durante 5 min a 20.000 g. Posteriormente, el filtrado se cargó en un filtro de 30 kDa de corte (Pall nanosep 30 K Omega) y se centrifugó durante 8 min a 20.000 g. Posteriormente, el filtrado se cargó en un filtro de 3 kDa de corte (Pall nanosep 3K Omega) y se centrifugó durante 15 min a 20.000 g.

30 Se redisolviéron los residuos sobre los tres filtros en 500 µl de agua MQ. Así se recogieron un total de cuatro muestras: residuo de 100 kDa (> 100 kDa), residuo de 30 kDa (30-100 kDa), residuo de 3 kDa (3-30 kD) y filtrado (~450 µl) que pasaron los tres filtros (<3 kDa). El contenido de proteína se determinó por Kjeldahl y se calcularon las concentraciones relativas de proteína entre todas las muestras produciendo una distribución de peso molecular.

Rendimiento de extracción de proteína

El rendimiento de extracción de proteína se define como:

35
$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Nitrógeno total en el sobrenadante}}{\text{Nitrógeno total en el material de partida seco}} \times 100 \%$$

Alternativamente, puede calcularse un rendimiento de extracción de proteína que incluye agua en sedimento por:

$$\% \text{ de rendimiento (incluyendo agua en sedimento)} = \frac{\text{Nitrógeno total en la fase acuosa incluyendo el agua en el sedimento}}{\text{Nitrógeno total en el material de partida seco}} \times 100 \%$$

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Se han probado varias proteasas y una amilasa para hidrolizar y separar (o extraer) proteínas de salvado de arroz desengrasado. La selección de la enzima se basó en el rendimiento de proteína en el sobrenadante o fase continua después de la incubación y posterior separación sólido-líquido. Se han seleccionado tanto un intervalo muy amplio (no específico) como varias proteasas muy específicas como Fromase 750TL®, Collupuline 200L®, Maxazyme NNP DS® y especialmente Brewers Clarex®, mientras que también se había probado amilasa Dexlo CL®. El pH y la temperatura de las incubaciones se ajustaron a la enzima específica como sigue:

10 Fromase 750TL® pH 5 50 °C, Brewers Clarex® pH 4 40 °C, Maxazyme NNP DS® pH 7 50 °C y Collupuline 200L pH 8 55 °C. La dosificación de enzima se estableció siempre en 0,5 ml/250 g de salvado de arroz desengrasado (para factibilidad económica) y las incubaciones se realizaron con 15 % en peso de sustrato en agua potable durante 1 h. Para detener la acción enzimática, todas las muestras se trataron con calor durante 5 min a 95 °C y posteriormente se centrifugaron.

Enzima	Rendimiento de extracción de proteína que incluye nitrógeno en agua del sedimento (%)	
	-	+
Brewers Clarex®)	10	11
Fromase (750 TL®)	12	15
Maxazyme NNP DS®)	12	41
Collupuline 200 L	15	36
Dexlo CL	12	19

15 La enzima Collupuline® 200 L mostró un rendimiento comparable a Maxazyme® NNP DS, pero más degradación de proteína y, por tanto, fue menos preferida.

Ejemplo 2

20 Se incubaron 9,63 gramos de SAD (salvado de arroz desengrasado) en 35 gramos de agua potable con la proteasa Maxazyme® NNP DS (dosificación 86 microlitros) a 50 °C durante 4 horas, se tomaron muestras durante varios intervalos de tiempo. Después de la incubación, las muestras se sometieron a choque térmico durante 10 minutos a 80 °C para inactivar la enzima después de realizar una separación S/L.

En la tabla a continuación se presenta el rendimiento de dos maneras:

1. rendimiento como se obtuvo después de la separación sólido/líquido y choque térmico basado en el sobrenadante obtenido.
- 25 2. rendimiento como puede calcularse basándose en la cantidad de agua añadida. Este valor refleja el máximo rendimiento teórico (lavado máximo del sedimento, la fracción sólida después de L/S).

Dosis de enzima	Tiempo (min)	Rendimiento de nitrógeno	Rendimiento de nitrógeno que incluye nitrógeno en la fase acuosa del sedimento	Proteína en materia seca (N*6,25)
86 microlitros	30	24,2 %	41,5 %	34,8 %
	45	24,4 %	43,9 %	34,6 %
	60	26,0 %	45,5 %	35,5 %
	90	25,6 %	48,7 %	36,0 %
	120	28,1 %	51,5 %	36,0 %

Dosis de enzima	Tiempo (min)	Rendimiento de nitrógeno	Rendimiento de nitrógeno que incluye nitrógeno en la fase acuosa del sedimento	Proteína en materia seca (N*6,25)
	180	30,3 %	56,0 %	36,6 %
	240	33,5 %	59,2 %	35,8 %
173 microlitros	30	27,0 %	45,1 %	36,4 %
	45	26,8 %	46,5 %	35,0 %
	60	29,5 %	49,5 %	38,3 %
	90	28,9 %	51,4 %	38,9 %
	120	30,4 %	53,2 %	37,6 %
	180	32,0 %	56,5 %	39,1 %
	240	33,7 %	58,5 %	37,8 %

Esta tabla muestra que puede obtenerse un producto con un contenido de proteína del 35 % al 39 % en base seca. Se obtuvo un rendimiento máximo del 34 %. En caso de que también se haga el lavado del sedimento (fracción sólida); son posibles rendimientos del 59 %.

5 Ejemplo 3

En un experimento adicional, se investigó si sería ventajoso si la separación S/L tuviera lugar antes del choque térmico para inactivar la enzima en lugar de después de este tratamiento térmico. Para esto, se siguió el procedimiento del Ejemplo 2, con 173 microlitros de dosis de enzima (Maxazyme NNP DS®).

Secuencia choque térmico-S/L	Tiempo (min)	Rendimiento de nitrógeno	Proteína en materia seca
Choque térmico-separación S/L	240	33,7 %	37,8 %
Separación S/L-choque térmico	240	41,2 %	38,7 %

- 10 En este experimento, se muestra evidentemente que el realizar primero la separación S/L y luego el choque térmico mejoró el rendimiento considerablemente en comparación con el choque térmico antes de la separación S/L. La proteína en contenido seco en este experimento se afectó ligeramente.

Ejemplo 4

- 15 Con los resultados como se obtuvieron a escala de ml (véanse los ejemplos previos), se realizó una producción a mayor escala (suspensión de 2 litros con 21,5 % en peso de salvado de arroz desengrasado para la incubación enzimática).

- 20 Se incubaron 385 gramos de SAD y 1415 g de potable agua (21,5 % en peso) durante 2 horas a 50 °C con adición de 1,54 ml de Maxazyme® NNP DS. Posteriormente, se realizó la separación sólido-líquido en una centrifuga Sorvall a 5000 g durante 10 minutos, seguido de un choque térmico de 10 minutos a 80 °C. El sobrenadante se secó en una secadora por pulverización a escala de laboratorio usando una temperatura del aire de salida de 100 °C.

Resultados:

Parámetro	Resultado
Rendimiento global en nitrógeno	36 %
Pureza de proteína (N*6,25)	34 %
Grado de hidrólisis	13,4 %

ES 2 665 773 T3

Parámetro	Resultado
Solubilidad de nitrógeno (pH = 6,8)	93 %
Capacidad de espumación (pH = 6,8)	205 ml
Estabilidad de espumación (pH = 6,8)	102 ml

Se probó el producto producido para el sabor y se encontró que tenía un sabor neutro y que tenía un buen perfil de sabor a diferencia de los hidrolizados de salvado de arroz con un grado de hidrólisis más alto.

Ejemplo 5

5 Una siguiente etapa en el aumento de escala fue la escala de planta piloto.

El proceso se realizó del siguiente modo:

Preparación de suspensión:

Se calentaron 1700 kg de agua potable a 54 °C. Se añadieron 295 kg de SAD y se mezclaron intensamente.

Hidrólisis

10 Se controló el pH entre 7,15 y 7,35 durante la hidrólisis. La temperatura se controló a entre 48 y 50 °C. A t=0 h se añadieron 1,2 kg de Maxazyme® NNP DS y después de 1 h otra vez 0,6 kg.

Separación sólido-líquido

Después de la hidrólisis, se usó un decantador para eliminar una gran parte de la fracción de fibra (sólido).

Clarificación

15 Para reducir más el contenido de fibra después del decantador, se aplicó una centrifugadora de discos estándar.

Pasteurización

La pasteurización se realizó a una temperatura de 75 °C con un tiempo de residencia de 10-15 s.

Evaporación

20 Se usó un evaporador "Holvrieka" de película descendente de 4 etapas. Los ajustes de temperatura de las diferentes etapas son: 75 / 68 / 62 / 51 °C con un tiempo de residencia de en total de 8 a 10 min.

Secado por pulverización

El secado tuvo lugar en una secadora por pulverización estándar. La temperatura del aire de salida se ajustó a 92 °C.

Resultados:

25

Composición:

	Materia
	[%]
Azúcares	37,5
Proteína	38,6
Ceniza	8,1
Grasa	2,3

Se encontró que el contenido de materia seca era del 96,1 %.

ES 2 665 773 T3

Solubilidad de nitrógeno:

<i>Solubilidad de nitrógeno [%]</i>	NaCl 0 mM añadido
pH = 4	64
pH = 6,8	78
pH = 8	85

Capacidad y estabilidad de espumación:

	Capacidad de espumación [ml]	Estabilidad de espumación [ml]
pH = 4	165	15
pH = 6,8	215	105
pH = 8	240	121

5

Distribución de peso molecular:

MW > 100 kD	23 %
30 kD < MW 100 kD	13 %
3 kD < MW < 30 kD	14 %
500 D < MW < 3 kD	47 %
MW < 500 D	3 %

Se encontró que la cantidad de di- y tri- péptidos era del 3 %, mientras que el contenido de aminoácidos libres era del 0,9 %. Por tanto, se encontró que la cantidad de (poli)péptidos con un peso molecular (MW) superior a 500 Da era del 97 %,

El grado de hidrólisis era del 11,8 %.

10 Se probó el producto producido para el sabor y se encontró que tenía un sabor neutro y que tenía un buen perfil de sabor a diferencia de los hidrolizados de salvado de arroz con un grado de hidrólisis más alto.

REIVINDICACIONES

5 1. Un hidrolizado de salvado de arroz desengrasado que comprende más del 90 %, preferentemente más del 95 %, de (poli)péptidos con un peso molecular (MW) superior a 500 Da y que tiene un GH (grado de hidrólisis) entre el 10 y el 16 % determinado como se define en el presente documento, y que tiene un contenido de proteína entre el 30 % en peso y el 45 % en peso, preferentemente entre el 35 % en peso y el 45 % en peso, en materia seca y que tiene una distribución de peso molecular (MW) de los (poli)péptidos presentes determinada como se define en el presente documento:

MW > 100000:	10 al 30 % en peso;
100000 > MW > 30000:	10 al 30 % en peso;
30000 > MW > 3000	10 al 30 % en peso;
3000 > MW > 500:	40 al 60 % en peso;
MW < 500:	inferior al 5 % en peso

2. Un hidrolizado de proteína de salvado de arroz desengrasado de la reivindicación 1 que tiene un contenido de aminoácidos libres inferior al 2 % en peso en materia seca.

10 3. Un hidrolizado de proteína de salvado de arroz desengrasado según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una solubilidad de nitrógeno a pH 6,8 del 75 al 100 % de SN.

4. Un hidrolizado de proteína de salvado de arroz desengrasado según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que tiene una capacidad de espumación de más de 200 ml, preferentemente 200 a 500 ml, y/o una estabilidad de espumación de más de 100 ml, preferentemente 100 a 200 ml.

15 5. Un proceso para producir un hidrolizado de salvado de arroz que comprende

- añadir una enzima o composición de enzima a una suspensión de salvado de arroz desengrasado que tiene una concentración de salvado de arroz de entre el 12 y el 30 % en peso;
- realizar una incubación con enzima a un pH entre 6 y 8;
- realizar la incubación con enzima a un grado de hidrólisis de entre un GH (grado de hidrólisis) del 10 y el 16 % determinado como se define en el presente documento;
- realizar la incubación con enzima a una temperatura de entre 45 y 65 °C; y
- separar el líquido de la fracción sólida;

por el cual la enzima o composición de enzima comprende una metalo-endoproteasa.

25 6. Un proceso para producir el hidrolizado de salvado de arroz según la reivindicación 5, en el que la endoproteasa es una bacilolisina (EC 3.4.24.28).

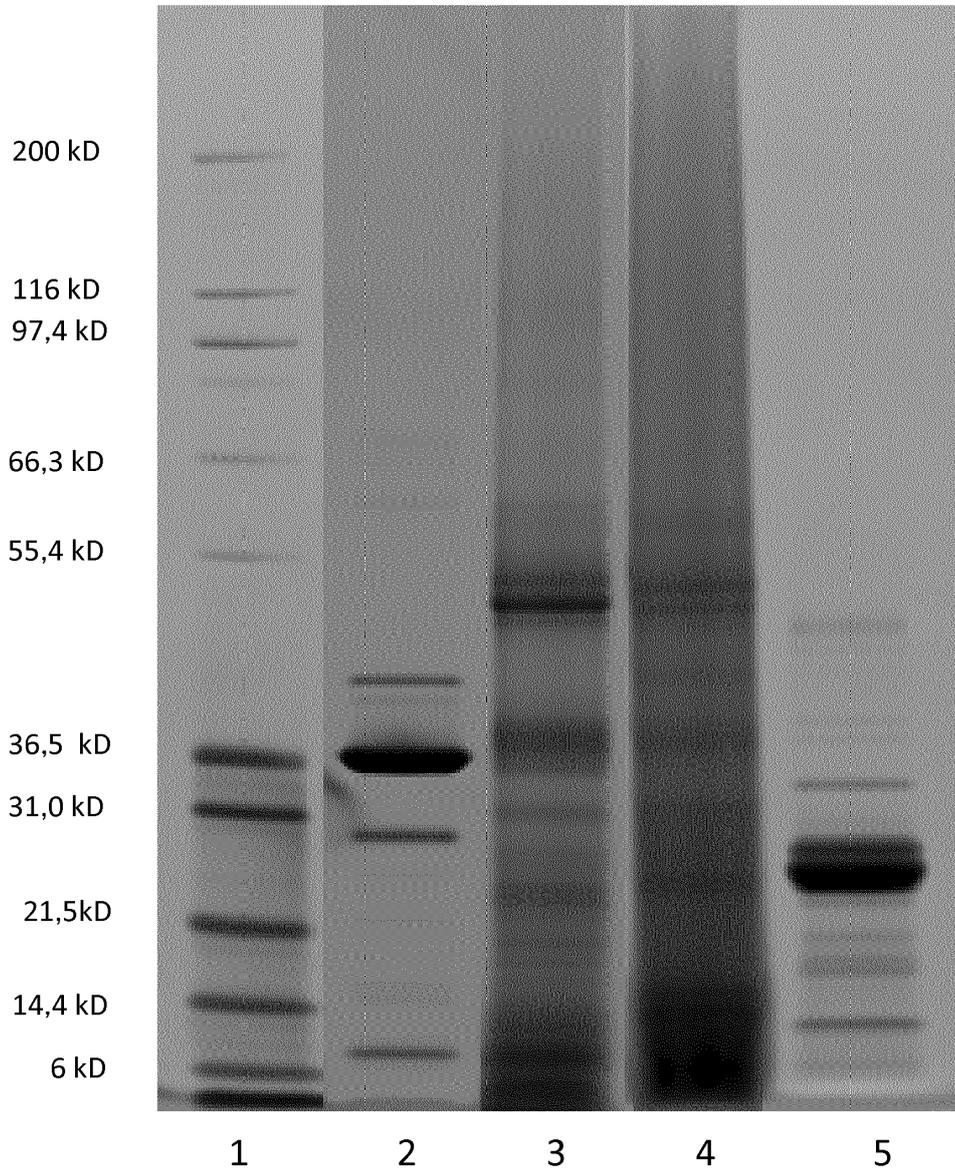


Fig 1