

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 773 796**

51 Int. Cl.:

<b>A23J 1/04</b>	(2006.01)	<b>A61K 8/98</b>	(2006.01)
<b>A23J 3/34</b>	(2006.01)	<b>A61K 35/60</b>	(2006.01)
<b>A23J 1/00</b>	(2006.01)	<b>A23K 10/26</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/18</b>	(2006.01)		
<b>A23K 50/80</b>	(2006.01)		
<b>A23K 50/40</b>	(2006.01)		
<b>A23K 20/147</b>	(2006.01)		
<b>A61K 8/00</b>	(2006.01)		
<b>A23K 10/22</b>	(2006.01)		
<b>A23J 1/10</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.01.2017 PCT/NO2017/050003**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **13.07.2017 WO17119820**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.01.2017 E 17736178 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3399871**

54 Título: **Un nuevo método para mejorar la hidrólisis enzimática y el aroma proteico y la bioactividad resultantes de los recortes de pescado**

30 Prioridad:

**06.01.2016 NO 20160022**

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

**14.07.2020**

73 Titular/es:

**HOFSETH BIOCARE ASA (100.0%)  
Havnegata 11  
6005 Ålesund, NO**

72 Inventor/es:

**FRAMROZE, BOMI y  
ROGNE, ROALD**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 773 796 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

Un nuevo método para mejorar la hidrólisis enzimática y el aroma proteico y la bioactividad resultantes de los recortes de pescado

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo método para mejorar la tasa de hidrólisis enzimática de recortes de pescado, mamíferos acuáticos, crustáceos y/o moluscos. Más particularmente, se refiere a un sistema de mezcla con turbina que comprende al menos un mezclador de turbina como componente de agitación, dando como resultado una hidrólisis de proteínas mucho más rápida, dando como resultado un perfil de sabor y olor significativamente mejorado del polvo de hidrolizado de proteínas que se produce generalmente a partir del secado por pulverización del hidrolizado proteico acuoso soluble resultante después de la hidrólisis y dando como resultado una bioactividad mejorada del polvo hidrolizado resultante.

15

**Antecedentes de la invención**

Los ingredientes bioactivos naturales se han vuelto cada vez más valiosos para los consumidores y el polvo de hidrolizado de proteínas producido a partir de subproductos de pescado después del fileteado es una fuente creciente de nutrición. Particularmente en la industria de la acuicultura, queda una tremenda cantidad de subproducto utilizable después de filetear y cortar en porciones el pescado para consumo humano directo. Una mejor utilización de esta cabeza, columna vertebral y piel que aumenta hasta el 40 % del peso de un salmón destripado agregará un valor significativo a toda la industria pesquera y reducirá la huella ambiental de la acuicultura al tiempo que aumentará considerablemente la sostenibilidad. Los péptidos aislados de diversas materias primas acuáticas tienen numerosas bioactividades beneficiosas para la salud, lo que los convierte en un ingrediente deseable en los alimentos para la salud humana (Framroze et al., J. Nut. Food Sci. 2015). Un desafío importante para comercializar estos ingredientes bioactivos de proteínas acuáticas de alta calidad consistente es su inestabilidad oxidativa muy alta. La oxidación de la materia prima durante el transporte y durante el procesamiento conduce a un grave deterioro de la calidad, pérdida de valor nutricional y malos olores y sabores fuertes. El uso de la hidrólisis enzimática para extraer proteínas de más del 40 % del peso del pescado que se descarta como subproductos del pescado se ha identificado como un procedimiento de procesamiento importante para hacer un mejor uso de nuestros recursos de alimentos marinos a nivel mundial. Varios métodos y compañías producen hidrolizados de proteínas de pescado bioactivos (FPH, por sus siglas en inglés) o péptidos de pescado. Aunque afirman que son adecuados para los mercados de suplementos y nutrición humanos, la mayoría de estos productos terminan como piensos para mascotas y animales. Un análisis más detallado de estos productos ha demostrado que, aunque los productos son de buena calidad, su fuerte sabor y olor a pescado hacen que su aplicación general en alimentos humanos de alto volumen, como bebidas en polvo y barras de proteínas, sea una tarea imposible. Los métodos para producir hidrolizados de proteínas de pescado de calidad mejorada y más específicamente, propiedades organolépticas deseables mejoradas, siguen siendo un objetivo de la invención importante.

40

R. Slizyte et al., Process Biochemistry, vol. 40, 2005, páginas 2012-2033 han estudiado cómo las mezclas de materias primas combinadas de diferentes subproductos de bacalao separados influyen en la composición del sustrato para la hidrólisis. También se ha estudiado la influencia del uso de una endopeptidasa (Flavourzyme) o exopeptidasa (Neutrase) y de la cantidad de agua añadida en el rendimiento, las propiedades nutricionales, fisicoquímicas y funcionales de los productos de hidrólisis. La hidrólisis se realizó en un recipiente de vidrio cerrado de 4 l agitado con un impulsor marino (150 RPM). La hidrólisis enzimática se inició cuando la temperatura de la mezcla era de 50 °C añadiendo bien 500 l de Flavourzyme al 0,1 % o 0,8 l de Neutrase al 0,3 %. La hidrólisis continuó durante 60 min. No se mostraron efectos sobre el sabor y el olor.

45

B.-H. Han et al., Bull. Korean Fish. Soc., vol. 23, n.º 2, 1990, páginas 109-124 describen un método para la fabricación de un hidrolizado a partir de residuos de caballa a utilizar en la preparación de salsa de pescado de estabilidad y aroma favorable de alta calidad. Los residuos picados se homogeneizaron con agua y se hidrolizaron mediante enzimas proteolíticas comerciales tales como Complex enzyme-2000 y Alcalasa en un recipiente cilíndrico con 4 deflectores y un impulsor de turbina de 6 vejigas. El pH y la temperatura óptimos para la hidrólisis con Complex enzyme-2000 fueron de 8,0 y 50 °C, y los de Alcalasa fueron de 9,0 y 55 °C. En ambos casos, el tiempo de hidrolización fue de 100 minutos. El tratamiento térmico del hidrolizado con 6 % de azúcar invertido durante 2 horas a 90 °C fue adecuado para la inactivación de las enzimas y la pasteurización del hidrolizado. El aroma, el sabor y el color del hidrolizado se mejoraron durante el tratamiento térmico debido a los productos de reacción de caramelización producidos debido a la adición de azúcar invertido. Los productos de la reacción de caramelización producen efectos antioxidantes y bactericidas.

50

El documento WO2014/068601 A1 divulga un proceso para obtener hidrolizados de proteínas acuáticas de alta calidad.

55

El documento WO2014/207497 A1 divulga un método para producir polvo de hidrolizado de proteínas marina soluble.

60

El documento US4288458 divulga un proceso para producir proteína de pescado licuada licuando carne picada de pescado.

## 5 Sumario de la invención

El objetivo de esta invención es abordar el problema de la oxidación durante la hidrólisis enzimática de proteínas acuáticas que conduce a propiedades organolépticas inaceptables y proporcionar a los consumidores un polvo de hidrolizado de proteínas acuáticas consistente de alta calidad con efectos nutracéuticos y para la salud positivos.

10 Los presentes inventores han identificado que los productos de oxidación que surgen durante la hidrólisis enzimática de los subproductos de pescado conducen a un mayor sabor y olor a pescado y también pueden tener un efecto negativo sobre la bioactividad. Además, sorprendentemente, se ha identificado que el uso de mezclador con turbina con el patrón de flujo axial durante el procesamiento de la proteína acuática hidrolizada enzimáticamente puede  
15 abordar este problema de forma suficiente. El mezclador con turbina de alta velocidad en comparación con el mezclador normal en un reactor inhibe la oxidación durante la hidrólisis al aumentar la tasa de hidrólisis en más de 3X(tres veces), reduce la inducción de oxígeno en la solución, lo que acelera la degradación oxidativa y contribuye a una mejora suficiente en el sabor y olor del pescado para que el polvo producido se pueda usar directamente en bebidas proteicas y barras producidas para consumo humano. El resultado de disminución de la degradación  
20 oxidativa se evidencia con una prueba de nivel de oxidación de sustancia reactiva con ácido tiobarbitúrico (TBARS), mientras que el resultado de bioactividad mejorada se evidencia mediante una prueba de absorción de hierro celular CACO-2 como se muestra en los ejemplos y figuras que se acompañan en este documento.

25 Además, se ha identificado que el uso del mezclador con turbinas de alta velocidad de acuerdo con la presente invención y durante la hidrólisis enzimática de proteínas acuáticas no solo puede inhibir la oxidación y mejorar el sabor y olor a pescado sino que también disminuye el sabor amargo del polvo del hidrolizado resultante, que es otro problema importante en el uso humano de hidrolizados de proteínas en general y de hidrolizados de proteínas de pescado en particular. Estos resultados se evidenciaron con una prueba de panel sensorial que se muestra en los ejemplos y figuras que se acompañan en el presente documento.

30 Por lo tanto, la presente invención proporciona un proceso para producir hidrolizados de proteínas acuáticas de alta calidad cuyo proceso comprende el uso de un sistema de mezclador con turbina de alta velocidad durante la hidrólisis enzimática. Esto da como resultado hidrolizados mejorados con propiedades organolépticas deseables y bioactividades potenciadas.

35 El proceso se define en las reivindicaciones adjuntas.

### Definiciones

40 Como se usa en el presente documento, las expresiones "mezclador con turbina", "mezclador con turbina de alta velocidad" y "mezclador con chorro" tienen el mismo significado y pueden considerarse como sinónimos. Los términos mencionados implican las siguientes características y propiedades:

- 45 • Patrón de flujo axial
- RPM típicas - 2000-4000
- Mezclador homogéneo
- Sin arrastre de aire
- Sin sedimentación
- Sin flotación de producto en la superficie
- 50 • Mezclador rápido de todo el contenido
- No se necesitan separadores/ deflectores de flujo
- Bajo corte debido al corto tiempo de residencia en el cabezal de mezclador da como resultado un tiempo de proceso corto

55 Esto contrasta con los términos "mezclador normal", "mezclador convencional" y "mezclador basado en impulsores" que implican las siguientes características y propiedades:

- 60 • Patrón de flujo radial (flujo rotacional)
- RPM máx - 200
- Mezclador no uniforme e incompleto
- Fuerte aireación, (Da como resultado: Oxidación, cambio de color, problemas con la transferencia de calor, etc.)
- Sedimentación
- Flotación
- 65 • Mezclador incompleto de los contenidos del recipiente
- Zonas muertas alrededor del área de los separadores

- Fuerzas de corte locales, largos tiempos de proceso

### Descripción detallada de la invención

5 La presente invención proporciona un proceso para producir un hidrolizado de proteínas acuáticas con hidrólisis enzimática, que comprende las etapas de:

- 10 a) someter un material fuente de proteínas, agua y una enzima a mezclado con turbina con un patrón de flujo axial para obtener hidrólisis enzimática del material de proteínas;
- 10 b) detener la hidrólisis enzimática desactivando la enzima con mezclado con turbina con un patrón de flujo axial;
- y
- c) separar la fracción de péptidos acuáticos hidrolizados obtenida del material sólido.

15 El material fuente de proteínas se selecciona de material de pescado, incluyendo músculo de pescado, piel de pescado, vísceras de pescado, espinas de pescado, cabezas de pescado, otros subproductos de pescado y cualquier combinación de los mismos; mamíferos acuáticos; crustáceos, incluidos crustáceos enteros, carne de crustáceo y conchas de crustáceos y subproductos de procesamiento; y moluscos.

20 En una realización preferida del proceso de acuerdo con la invención, el proceso comprende moler o picar el material fuente de proteínas en presencia de agua y utilizar la pulpa picada en la reacción de hidrólisis.

25 La enzima utilizada se selecciona del grupo que consiste en proteasas de especies bacterianas, fúngicas o marinas, que pueden ser una mezcla de endo y exoproteasas de cepas de *Bacillus*, Subtilisina, incluyendo Subtilisina de *Bacillus licheniformis* tales como Alcalase®, Protamex®, Flavourzyme®, Neutrase®, Protease A "Amano", Pescalase®, Fromase™, Promod31™ y Maxatase™.

30 En una realización preferida del proceso de acuerdo con la invención, el mezclado con turbina tiene lugar en un sistema de mezclado con turbina incorporado en el reactor desde el lado o la parte superior y puede sumergirse total o parcialmente en la masa de reacción.

De acuerdo con otra realización preferida del proceso, este comprende las etapas de:

ajuste del material de proteína antes de la hidrólisis a un contenido de proteínas en el intervalo de 0,1 % a 30 % p/v (proteína/agua);

ajuste de dicho material a un pH en el intervalo de 5 a 9;

35 ajuste de la mezcla a una temperatura conveniente a la cual la(s) enzima(s) seleccionada(s) no se inactiva(n) por calor, en el intervalo de 30 a 80 °C;

permitir que la hidrólisis enzimática continúe durante un período en el intervalo de aproximadamente 10 minutos a 1 hora o hasta que el grado de hidrólisis (% de DH, por sus siglas en inglés) haya alcanzado un valor deseado en el intervalo de 2 a 70 % de DH; y

40 detener la hidrólisis enzimática desactivando la enzima.

La detención de la hidrólisis enzimática de acuerdo con la etapa b) del presente proceso se lleva a cabo mediante la desactivación de la enzima empleada con una etapa de detención seleccionada entre:

45 (i) elevar la temperatura de dicha mezcla de reacción a un nivel no inferior a 60 °C, durante 5 a 60 minutos, seguido de enfriamiento, y

(ii) desactivación de la enzima empleada alterando el pH a un pH donde dicha enzima se desactiva, tal como un pH inferior a aproximadamente 5 o superior a aproximadamente 9.

50 En una realización preferida del proceso, la fracción de péptidos acuáticos hidrolizados y el material sólido obtenido en la etapa b) del proceso se separan por concentración.

La separación del hidrolizado de proteínas se puede realizar por filtración.

55 En una realización preferida del proceso, la separación del hidrolizado de proteínas se realiza por filtración usando membranas de ultrafiltración (UF), preferentemente con un límite de peso molecular seleccionado de 30, 10, 5, 3 y 1 kDa.

60 En otra realización preferida del proceso, la separación del hidrolizado de proteínas se realiza por centrifugación a una velocidad entre 500 y 10000 G y por eliminación del residuo obtenido.

Es decir, la recuperación del hidrolizado de proteínas se puede realizar por concentración. De acuerdo con una realización adicional del proceso, la fracción de péptidos acuáticos hidrolizada obtenida se somete a secado.

65 Es decir, la recuperación del hidrolizado de proteínas se puede realizar por secado.

De acuerdo con aún otra realización adicional del proceso, el material sólido separado en la etapa c) se seca y se

tamiza para producir huesos que tienen menos del 1 % p/p de proteína en la superficie del hueso. Preferentemente, el tamizado en seco se lleva a cabo utilizando una serie de tamices vibrantes de tamaño de malla decreciente.

De acuerdo con una realización del proceso, se sigue o mide el grado de hidrólisis en el producto final.

5 También se proporciona un hidrolizado de proteínas acuáticas, obtenible por el proceso definido anteriormente.

10 Dicho hidrolizado de proteínas acuáticas tiene un valor TBARS reducido en comparación con los hidrolizados de proteínas acuáticas producidos sin mezclado con turbina, lo que da como resultado un hidrolizado de proteínas que tiene un perfil organoléptico mejorado.

15 Dicho hidrolizado de proteínas acuáticas también tiene un perfil de captación de hierro aumentado en comparación con los hidrolizados de proteínas acuáticas producidos sin mezclado con turbina, lo que da como resultado un hidrolizado de proteínas que tiene una perfil bioactividad mejorada.

El hidrolizado de proteínas acuáticas de la presente invención puede estar en una forma seleccionada de una cápsula; una forma desecada, incluyendo forma en polvo, copos, gránulos, microgránulos; un líquido; un semilíquido; una suspensión; una emulsión; y un jarabe.

20 Además, en el presente documento también se proporciona el uso del hidrolizado de proteínas tal como se produce de acuerdo con el proceso de la presente invención y se define anteriormente, en un producto alimenticio, un suplemento alimenticio, piensos para mascotas, pienso para animales, pienso para peces, fertilizantes, productos cosméticos, preparaciones farmacéuticas, preparaciones nutracéuticas y medicamentos.

## 25 Descripción detallada de los dibujos

30 La Figura 1 ilustra la oxidación según el ensayo TBARS ( $\mu\text{mol}$  de malondialdehídos (MDA)/kg de muestra) durante la formación de los diferentes hidrolizados de proteínas de salmón a varias velocidades de turbina/mezclado durante la hidrólisis; SPH-N (mezclado normal), SPH-T (mezclado con turbina) medida en función del grado de hidrólisis (DH) (%).

La Figura 2 muestra una gráfica de las puntuaciones medias de los atributos de olor y sabor del polvo SPH-N y SPH-T con un grado de hidrólisis del 20 %.

35 La Figura 3 muestra el aumento basado en células CACO-2 in vitro en la propiedad de captación de hierro para SPH-N y SPH-T a diversos grados de hidrólisis.

El proceso de autooxidación y desarrollo de rancidez en los alimentos se caracteriza por un mecanismo en cadena de radicales libres que avanza a través de etapas de iniciación, propagación y terminación.

40

Iniciación:  $\text{LH} \rightarrow \text{L}\cdot$   
 Propagación:  $\text{L}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{LOO}\cdot$   
 $\text{LOO}\cdot + \text{LH} \rightarrow \text{LOOH} + \text{L}\cdot$   
 Terminación:  $\text{LOO}\cdot + \text{LOO}\cdot \rightarrow$   
 $\text{LOO}\cdot + \text{L}\cdot \rightarrow$  sin productos radicales  
 $\text{L}\cdot + \text{L}\cdot \rightarrow$

45 Se forman radicales libres e hidroperóxidos altamente inestables que destruyen péptidos bioactivos y pequeñas vitaminas orgánicas y ayudan a desarrollar malos sabores en los polvos de hidrolizado de proteínas resultantes. La mayoría de las especies acuáticas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados y contienen prooxidantes como hemoglobina y hierro. Estos componentes musculares interactúan en gran medida durante el procesamiento de la hidrólisis enzimática y el mal sabor y olor resultantes se transfieren al polvo hidrolizado de proteínas acuáticas final. Por lo tanto, se ha demostrado que las condiciones de reacción durante la hidrólisis enzimática demuestran un gran impacto en la oxidación. Los compuestos causantes, tales como cetonas, aldehídos y alcoholes se forman a un ritmo constante durante la hidrólisis enzimática debido a las condiciones ideales de pH ligeramente ácido, temperatura de 50 60 °C y medio acuoso. Después se unen a proteínas y péptidos y forman complejos de lípidos-proteínas insolubles que conducen al mal sabor y olor.

55 Para medir el progreso de la oxidación como una variante durante diversas técnicas de mezclado, fue necesario seguir la transformación y/o formación de reactivos, intermedios y productos. Debido a que muchos de estos compuestos son muy inestables y se ven afectados de manera diferente por la presencia de oxígeno, prooxidantes y antioxidantes, se utilizó el método universal TBARS para medir la oxidación en todas sus formas. Se ha encontrado que TBARS es un muy buen indicador de la oxidación de lípidos en productos de alimentos marinos y a menudo está bien correlacionado con las pruebas sensoriales. Como puede observarse en la Figura 1, El mezclado con turbina de subproductos de pescado produce una oxidación significativamente menor para el mismo grado de

hidrolizado de proteínas hidrolizadas. Esto se puede atribuir tanto a la mayor tasa de hidrólisis enzimática para el sistema de mezclado con turbina (como se muestra a continuación en el ejemplo 1) así como a la falta de extracción en solución de gases de espacio de cabeza, particularmente oxígeno y radicales libres volátiles producidos oxidativamente que se produce significativamente durante el mezclado normal y que está muy minimizada en el mezclado con turbina. El oxígeno disuelto y los radicales libres producidos oxidativamente aumentan la velocidad de oxidación del producto hidrolizado de proteínas de pescado en solución para polvo de hidrolizado de proteínas mezclado normal (SPH-N) frente al polvo de hidrolizado de proteínas mezclado con turbina (SPH-T).

La reducción en el valor de TBARS conduce a una mejora en el perfil organoléptico como se muestra en la Figura 2. Se midieron varios perfiles de sabor y olor durante la prueba que se puntuó de 0 a 100. El olor y sabor rancio del pescado y los perfiles de sabor a pescado, agrio y amargo mejoraron significativamente para el polvo de proteínas hidrolizadas mezclado con turbina (SPH-T) frente a mezclado normal (SPH-N) de manera comparable.

Finalmente, el polvo de hidrolizado de proteínas mezclado con turbina también mostró una bioactividad mejorada medida por un ensayo de células CACO-2 in vitro para medir la captación de hierro. Tal como puede observarse en la Figura 3, el polvo de hidrolizado de proteínas mezclado con turbina (SPH-T) tiene una capacidad de captación de hierro significativamente mejor en comparación con el polvo de hidrolizado de proteínas mezclado normal (SPH-N).

Las características de la invención mencionadas anteriormente, así como otras, surgirán más claramente de una lectura de la siguiente descripción de una realización de ejemplo, pretendiendo que dichos ejemplos sean ilustrativos y no limitantes.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### El efecto del mezclado con turbina frente a agitación normal sobre los niveles de oxidación (TBARS) en polvo de hidrolizado de proteínas de salmón hidrolizadas con enzimas

Las espinas dorsales y las cabezas de salmón separadas y molidas después del fileteado de salmón entero, se someten a hidrólisis de proteínas usando un extracto de la proteasa papaína. La única variable en la experimentación es el método de mezclado empleado, con turbina frente a agitación normal usando una varilla agitadora y agitador de paletas.

Se muele en trozos más pequeños 1 kg de columna vertebral y cabeza de salmón utilizando una licuadora Waring de modo que los trozos resultantes tengan un tamaño de entre 5 mm y 4 cm. Se añadieron 100 g de este material en un reactor de vidrio encamisado de 1 litro y se añadieron 200 ml de agua tibia a 60 °C. La masa resultante se calienta nuevamente a 60 °C usando agua caliente en el encamisado. Para la producción del polvo de hidrolizado de proteínas agitado Normal (SPH-N), el reactor está equipado con una varilla de agitación unida a un motor en el extremo superior y un agitador de 4 paletas en el extremo inferior, 1 pulgada (1.27 cm) desde el fondo del reactor. Para la producción del polvo de hidrolizado de proteínas agitado con Turbina (SPH-T), el reactor está equipado con un mezclador de turbina que está total o parcialmente desde el lado o la parte superior del reactor, sumergida en la mezcla de reacción.

Se inicia la agitación y se mantiene a 50 RPM para el agitador normal y a una velocidad de agitación con formación de vórtice máxima para el agitador de turbina y se añade 1 g del extracto de proteasa papaína al reactor. La reacción se agita y se extraen aproximadamente 10 ml de material del reactor a tiempos designados y se centrifuga a 6000 RPM para separar la masa en capas sólidas, de agua y de aceite. La capa de agua se extrajo con una pipeta y se secó hasta un polvo en un liofilizador y se determinó el grado de hidrólisis frente a los valores de TBARS utilizando métodos bien descritos en la técnica, a diferentes grados de hidrólisis y se representaron gráficamente como se muestra en la Figura 1.

La Tabla 1 a continuación también muestra una comparación directa del tiempo frente al grado de hidrólisis para SPH-N y SPH-T, revelando el tiempo de hidrólisis mucho más rápido para las reacciones de hidrólisis mezcladas con turbina.

**Tabla 1 - Tiempo frente a Grado de Hidrólisis para SPH-N y SPH-T**

Tiempo	% de DH - SPH-N	% de DH - SPH-T
<b>5 minutos</b>	4	9
<b>10 minutos</b>	7	17
<b>15 minutos</b>	12	26
<b>20 minutos</b>	17	31
<b>25 minutos</b>	23	38

#### Ejemplo 2

El efecto del mezclado con turbina frente a agitación normal sobre el rendimiento organoléptico en polvo de hidrolizado de proteínas de salmón hidrolizadas con enzimas

- 5 Un panel de expertos analizó los polvos de hidrolizado de proteínas de salmón secos liofilizados de ambos métodos de mezclado SPH-N y SPH-T para determinar las propiedades organolépticas frente a seis descriptores en una escala creciente de 10 a 100 utilizados por la industria marina para sus productos y los resultados se representaron gráficamente en la Figura 2.

10 **Ejemplo 3**

El efecto de mezclado con turbina frente a agitación normal sobre el rendimiento de bioactividad medido por los niveles de captación de células CACO-2 por el polvo de hidrolizado de proteínas de salmón hidrolizadas por enzimas

- 15 Los cultivos celulares intestinales, como las líneas celulares Caco-2, han ganado popularidad como modelo *in vitro* de captación de hierro. La línea celular de carcinoma de colon humana, Caco-2, se cultiva en membranas microporosas en cámaras bifurcadas y las células se diferencian espontáneamente en enterocitos bipolares que muestran muchas de las características de las células epiteliales normales. (microvellosidades, uniones intercelulares estrechas y enzimas asociadas al borde). Las células se diferencian de manera que el polo apical se  
20 extiende hacia la cámara superior y el polo lateral basal queda expuesto a la cámara inferior. El estudio puede medir la captación de hierro de la cámara apical, el transporte a la célula y la secreción a la cámara basal. Estas células tienen una cinética de transporte de hierro que admite una vía de transporte de hierro tanto saturable como no saturable, similar a las observaciones en intestinos humanos y animales. Cabe señalar que solo se utilizó el hierro extrínseco añadido (10  $\mu\text{mol/L}$ ) para medir la captación de hierro en este experimento, ya que no hay una forma  
25 precisa disponible para determinar la captación de hierro intrínseco y, por lo tanto, los valores mostrados representan la captación mínima que se habría producido en cada producto de digestión que es una suposición similar a la realizada en estudios en seres humanos.

- 30 Se utilizó en este ensayo una forma modificada del kit de ensayo Caco-2 de 24 pocillos disponible comercialmente de Celsis In vitro Technologies.

- El kit de Celsis se colocó previamente en la placa con células Caco-2 con filtros Corning Transwell®. Estos cultivos de Caco-2 se consideran aceptables para estudios de transporte y cumplen con los criterios de resistencia eléctrica transepitelial (TEER, por sus siglas en inglés) de 1000 ohmios. Se estudió la captación de hierro con células Caco-2  
35 cultivadas en soportes de membrana permeables durante 16 días, momento en el cual las células están completamente diferenciadas. En el momento cero, se añadieron 1,5 ml de las diferentes soluciones de proteínas (1 % -32 %) y  $^{59}\text{Fe}$  (10  $\mu\text{mol/l}$ ) a las cámaras apicales de los insertos. Las placas se recubrieron e incubaron a 37°C en un baño de agua con agitación durante 120 minutos. Para evaluar la captación de  $^{59}\text{Fe}$  por las diferentes soluciones de proteínas (1 % -32 %), se retiraron las membranas, se lavaron suavemente con PBS y se colocaron en los viales de centelleo. Se añadieron cinco ml de cóctel de centelleo líquido a cada vial de centelleo y se midieron los  
40 recuentos radiactivos en un contador de centelleo líquido multipropósito Beckman LS 6500. La captación de hierro por las monocapas celulares se expresó como nmol/pocillo. Se examinaron tres pocillos por tratamiento y los experimentos se repitieron tres veces para dar  $n = 9$  pocillos por tratamiento.

- 45 La Tabla 2 y la Figura 3 muestran los resultados de la captación de hierro por CACO-2 para el polvo de SPH-N y SPH-T en diversos grados de polvos de hidrólisis.

Tabla 2 - Valores de captación de hierro por CACO-2 para SPH-N y SPH-T

% de DH	Captación de hierro (nmol/célula) SPH-N	Captación de hierro (nmol/célula) SPH-T
0	0,021	0,019
4	0,035	0,041
8	0,055	0,073
15	0,136	0,155
26	0,139	0,167

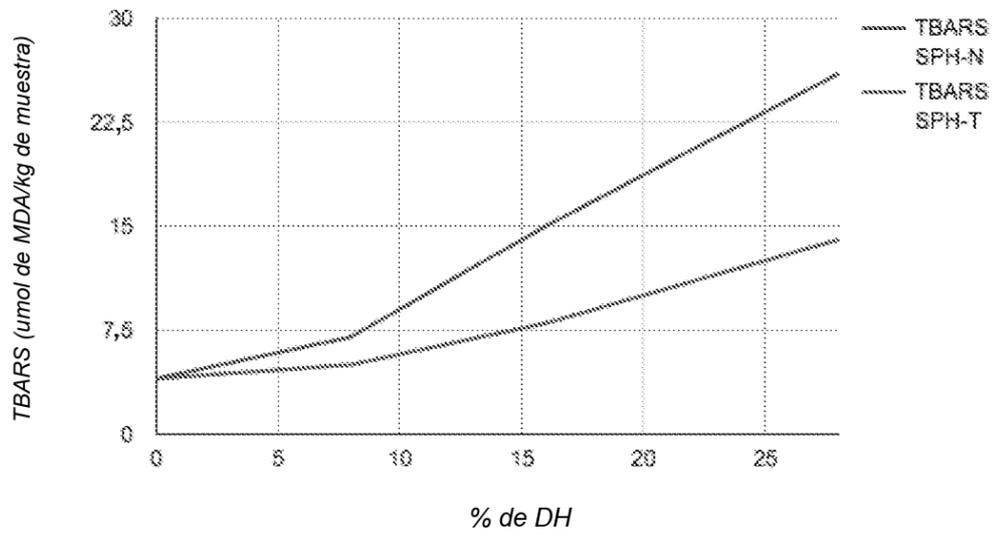
50

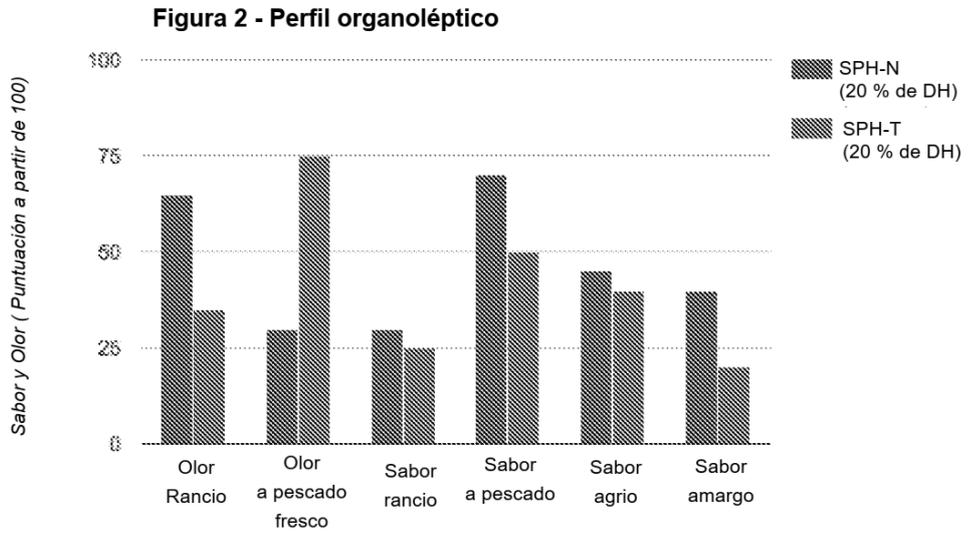
**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para producir un hidrolizado de proteínas acuáticas con hidrólisis enzimática, que comprende las etapas de:
- 5 a) someter un material fuente de proteínas, agua y una enzima a mezclado con turbina con un patrón de flujo axial para obtener hidrólisis enzimática del material de proteínas;
- b) detener la hidrólisis enzimática desactivando la enzima con mezclado con turbina con un patrón de flujo axial; y
- 10 c) separar la fracción de péptidos acuáticos hidrolizados obtenida del material sólido.
2. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicho mezclado con turbina tiene lugar en un sistema de mezclado con turbina incorporado en el reactor desde el lado o la parte superior y puede sumergirse total o parcialmente en la masa de reacción.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 1, en donde la enzima se selecciona del grupo que consiste en proteasas de especies bacterianas, fúngicas o marinas.
4. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el material fuente de proteínas se selecciona de material de pescado, incluyendo músculo de pescado, piel de pescado, vísceras de pescado, espinas de pescado, cabezas de pescado, otros subproductos de pescado y cualquier combinación de los mismos; mamíferos acuáticos; crustáceos, incluidos crustáceos enteros, carne de crustáceo y conchas de crustáceos y subproductos de procesamiento; y moluscos.
- 20 5. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el material fuente de proteínas se somete a molienda o troceado en presencia de agua, y utilizando la pulpa picada en la reacción de hidrólisis.
6. El proceso de la reivindicación 5, que comprende además las etapas de:
- 30 - ajuste del material antes de la hidrólisis a un contenido de proteínas en el intervalo de 0,1 % a 30 % p/v (proteína/agua);
- ajuste de dicho material a un pH en el intervalo de 5 a 9;
- ajuste de la mezcla a una temperatura conveniente a la cual la(s) enzima(s) seleccionada(s) no se inactiva(n) por calor, en el intervalo de 30 a 80 °C;
- 35 - permitir que la hidrólisis enzimática continúe durante un período en el intervalo de aproximadamente 10 minutos a 1 hora o hasta que el grado de hidrólisis (% de DH) haya alcanzado un valor deseado en el intervalo de 2 a 70 % de DH; y
- detener la hidrólisis enzimática desactivando la enzima.
- 40 7. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la separación de la fracción de péptidos acuáticos hidrolizados del material sólido en la etapa c) se lleva a cabo por concentración y recogiendo dicha fracción.
8. El proceso de la reivindicación 7, que comprende además el secado de dicha fracción.
- 45 9. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en donde la etapa de detención b) se selecciona de:
- 50 (i) elevar la temperatura de dicha mezcla de reacción a un nivel no inferior a 60 °C, durante 5 a 60 minutos, seguido de enfriamiento; y
- (ii) desactivación de la enzima empleada alterando el pH a un pH donde dicha enzima se desactiva, tal como un pH inferior a aproximadamente 5 o superior a aproximadamente 9.
10. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en donde se sigue o mide el grado de hidrólisis en el producto final.
- 55 11. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en donde la separación del hidrolizado de proteínas se realiza por filtración.
- 60 12. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en donde la separación del hidrolizado de proteínas se realiza por filtración usando membranas de ultrafiltración (UF), preferentemente con un límite de peso molecular seleccionado de 30, 10, 5, 3 y 1 kDa.
- 65 13. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en donde la separación del hidrolizado de proteínas se realiza por centrifugación a una velocidad entre 500 y 10000 G y por eliminación del residuo obtenido.

14. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriormente mencionadas, en donde la recuperación del hidrolizado de proteínas se realiza por concentración.
- 5 15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la recuperación del hidrolizado de proteínas se realiza por secado.

Figura 1 - TBARS frente a % de DH





**Figura 3 - CACO-2-Perfil de captación de hierro**

