

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 116 937**

② Número de solicitud: 9602526

⑤ Int. Cl.⁶: A23J 3/34

C07F 1/12

A23L 1/305

A61K 38/01

A23K 1/16

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **29.11.96**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.98**

Fecha de concesión: **21.01.99**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.99**

⑮ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.03.99

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Serrano, 113
28006 Madrid, ES
Universidad de Sevilla**

⑱ Inventor/es: **Millán Rodríguez, Francisco;
Bautista Palomas, Juan y
Olías Jiménez, José Manuel**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis y sus aplicaciones.**

㉑ Resumen:

Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis y sus aplicaciones.

El procedimiento comprende una primera fase de eliminación de polifenoles de los aislados vegetales de partida, seguido de un doble tratamiento de hidrólisis, primero con endoproteasas inespecíficas y después con endoproteasas específicas y exoproteasas.

Las peptonas hidrolizadas así obtenidas tienen aplicación en la Industria Agroalimentaria y Médico-Farmacéutica, especialmente en los sectores de la alimentación humana y animal y la nutrición clínica.

ES 2 116 937 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

DESCRIPCION

Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis y sus aplicaciones.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la Industria Agroalimentaria y de la Industria Médico-Farmacéutica, refiriéndose especialmente a los sectores de alimentación humana y animal y alimentación clínica.

Más concretamente, la presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de peptonas vegetales con un elevado grado de hidrólisis de gran interés en los citados sectores técnicos.

Estado de la técnica anterior a la invención

La disponibilidad de distintas clases de hidrolizados, en cantidad suficientemente grande y a precios razonables, sería de una gran importancia y utilidad para la elaboración de dietas de tipo especial, que actualmente resultan muy caras y por ello frecuentemente no se utilizan, aunque desde el punto de vista médico-nutritivo sean aconsejables.

La sociedad actual, y en particular la de los países desarrollados, no precisa de hidrolizados al azar [Parrado J., Millán F., Hernández-Pinzón I., Bautista J. and Machado A., 1993, *Process Biochem.*, 28, 109-113; Ziajka S., Dzwolak W. and Zubel J., 1994, *Milk Science International*, 49,7] destinados a la nutrición en general, cultivo de microorganismos, aditivos de bebidas, etc. Hoy en día, se precisa de hidrolizados de composición y características bien definidas, bien porque no existen en el mercado, bien porque los que existen son muy caros y precisan de su abaratamiento. Disponer de hidrolizados con una composición aminoácida definida [Parrado J., Millán F., Hernández-Pinzón I., Bautista J. and Machado A., 1993, *J. Agr. Food Chem.* 41, 1821-1825; Bautista J., Hernández-Pinzón I., Alaiz M., Parrado J. and Millán F., 1996, *J. Agr. Food Chem.*, 44, 967-971] es algo muy deseable tanto para la industria alimentaria como para la médico-farmacéutica [Fürst P. 1992, *Clin. Nutr.* 10, 519-529]. Así por ejemplo, los hidrolizados enriquecidos en aminoácidos ramificados (AAR), bien con mezclas de aminoácidos libres o con péptidos ricos en AAR se han utilizado con éxito en el tratamiento de diversas patologías hepáticas, especialmente encefalopatías [Grunggreiff K., Kleine F.D., Musie H.E., Dietsch U., Franke D., Klanck S., Page I., Kleine S., Lossne B. and Pfeiffer K.P., 1993, *Z. Gaskoenterol.*, 31, 235-241; Rossi-Fanelli F., 1990, *Adv. Exp. Med. Biol.* 272, 227-233]

La producción de hidrolizados protéicos, a partir de residuos ricos en proteínas, (harinas de carne) y fuentes no convencionales de proteínas (proteínas vegetales) [Anuario de Estadística Agraria 1996, Ed. Servicio Técnico del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.; Boatright W.L., Hettiarachchy N.S. 1995 *JAOC*, 72, 1445-1451; Paredes-López O., Ordorica-Falomir C., Olivares-Vázquez M.R., 1991 *J. Food Sci.*, 56, 726-729; Ulloa J.A., Valencia M.E., Garcia Z.H. 1988, *J. Food Sci.* 53, 1396-1398] es un proceso bien establecido en la industria alimentaria.

La hidrólisis enzimática es un proceso muy

eficiente, que además puede ser llevado a cabo en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, con lo que la calidad nutricional de los aminoácidos se mantiene prácticamente inalterada, ya que no tiene lugar la destrucción o modificación de ciertos restos aminoácidos como ocurre en el caso de hidrólisis química. En la hidrólisis enzimática se evita la neutralización de los hidrolizados y, por lo tanto el alto contenido en sales, que limitaría el uso de los hidrolizados en ciertas aplicaciones, como por ejemplo en alimentos dietéticos y preparados parenterales.

En los últimos años se está intentando desarrollar un gran número de procesos de hidrólisis enzimática de proteínas a escala comercial. El interés de este tipo de procesos es grande, si bien, la producción de hidrolizados protéicos simples no es un problema, la producción de hidrolizados definidos, es decir, bien caracterizados, tal como exige el mercado, sigue siendo un gran problema y constituye el mayor reto de este campo. Este último tipo de hidrolizado, a ser posible, debería reunir las siguientes características: i) composición perfectamente definida, en relación a sus aminoácidos integrantes (aminograma), como a su distribución de tamaño (% en péptidos, oligopéptidos, tetra-tri-dipéptidos y aminoácidos libres), ii) ausencia o muy bajo sabor amargo y iii) ser hipoalergénicos.

Las patentes existentes sobre la obtención de hidrolizados protéicos, que abarcan tanto la vía química (uso de ácidos o bases) como la vía enzimática (uso de enzimas), son generales, no indicando los sustratos utilizados ni, en el caso de las hidrólisis enzimáticas, las enzimas usadas, y por supuesto no se indican las especificidades (Patente 489358, N° 2278/79 Registro de la Propiedad Industrial Nestlé).

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis.

Más concretamente, en la presente memoria se describe el proceso para la obtención de hidrolizados enzimáticos de proteínas vegetales con un alto grado de hidrólisis (GH 50%) especificando, el/los sustrato(s) que se utiliza(n) [girasol, colza, garbanzo, lenteja, lupinus y orujo], y las enzimas usadas, incluyendo su nombre comercial. El procedimiento constituye la base para la obtención de lo que se ha dado en denominar "hidrolizados a la medida".

El primer objetivo a cubrir es la preparación de los sustratos, que en todos los casos implica la eliminación de los polifenoles. La eliminación de los polifenoles, presentes en todos los aislados de proteínas vegetales, es necesario porque estas sustancias inhiben de manera general la actividad enzimática de las proteasas, por lo que su eliminación es obligada para el buen funcionamiento del proceso.

El segundo gran objetivo es la optimización del proceso de hidrólisis cuyo tratamiento con más de una proteasa, se basa en la resistencia a la hidrólisis de los epítomos alérgicos presentes en las proteínas. Por ello en un primer tratamiento las proteínas se hidrolizan con una(s)

endoproteasa(s) con actividad(es) inespecíficas, para en un segundo paso, una vez alcanzado, un grado de hidrólisis prácticamente constante (12-15% dependiendo del sustrato) se añaden conjuntamente una mezcla de endoproteasas más específicas y exoproteasas (que dan lugar a grados de hidrólisis $\geq 50\%$) con lo que las probabilidades de destruir los epítomos alergénicos es prácticamente total, además de eliminar el posible sabor amargo de algunos de los hidrolizados. Los enzimas proteolíticos que se han de utilizar en cada sustrato son: alcalasa, kersa y flavourzyme para proteínas de girasol; L-600 y flavourzyme para colza; alcalasa y flavourzyme para proteínas de garbanzo, lenteja y lupino; alcalasa y kersa para proteínas de orujo. Los hidrolizados se concentran y atomizan para dar un producto seco.

A continuación se indican las características y especificaciones de los enzimas proteolíticos antes mencionados empleados en la presente invención:

- Alcalasa: más concretamente, alcalasa 2.4L, es una proteasa bacteriana, altamente eficaz, desarrollada especialmente para la hidrólisis de todo tipo de proteínas. Se produce a partir de una cepa seleccionada de *Bacillus licheniformes*. Es una endopeptidasa de un peso molecular aproximado de 27.300 daltons. Fácilmente soluble en agua en todas las concentraciones, con una densidad de 1,18 gr/ml. Tiene una actividad de 2,4 Unidades Anson por gramo (AU/gr), pH óptimo 8 y temperatura óptima 50°C-60°C. Se presenta en forma líquida y es de la casa Novo Nordisk Bioindustrial, S.A.

- Flavourzyme: más concretamente, flavourzyme 1.000 MG, se produce por fermentación del *Aspergillus oryzae* y contiene actividad endoproteasa y exopeptidasa. El peso molecular difiere de las diferentes endoproteasas, ya que se trata de un complejo endo y exoproteasas. Fácilmente soluble en agua, tiene una actividad de 1.000 LAPU/g, pH óptimo de 7 y temperatura óptima de 50°C. Se presenta en forma granulada y es de la casa Novo Nordisk Bioindustrial, S.A.

- Kersa: es un enzima microbiana y se obtiene a partir del *Streptomyces fradiae*. Es una mezcla de endo y exo-peptidasa, las cuales se comportan como serin proteasa y es estable en presencia de oxígeno. Es atóxica, libre de antibióticos y de contaminación bacteriana. Fácilmente soluble en agua, tiene una actividad de 10^{-8} unidades Katal/mg de acuerdo al método Anson. Tiene un peso molecular aproximado de 20.000 Daltons. El pH máximo de actividad es de 8 y temperatura óptima la de 55°C. Se presenta en forma de polvo y es producida por la Compañía Española de la Penicilina y Antibióticos, S.A. (CEPA, S.A.).

- L-660: es una serin proteasa microbiana. Es una endoproteasa, de un peso molecular aproximado de 22.500 daltons, pH óptimo de 10 y temperatura óptima de 60°C. Fácilmente soluble en agua, tiene una actividad de 660.000 DU/ml. (Delf/ml). Se presenta en forma líquida y es de la casa MKC.

De acuerdo con lo anterior, el procedimiento de la presente invención permite obtener a escala semipreparativa a partir de residuos agroindustriales (girasol, colza, orujo, altramuza, etc) concentrados y aislados proteicos. Estos concen-

trados y aislados proteicos constituyen el punto de partida para la obtención de diferentes tipos de hidrolizados, mediante el uso de proteasas. Además, es posible obtener de una manera práctica: hidrolizados ricos en Aa-ramificados, hidrolizados ricos en glutamina, destinados a la nutrición clínica, hidrolizados ricos en AA-azufrados destinados a la nutrición animal de terneros y lechales, así como hidrolizados hipoalergénicos destinados a la alimentación infantil.

Breve descripción de la figura

La única figura que se adjunta a la presente descripción representa un esquema ilustrativo de una realización particular del procedimiento de la invención. En dicho esquema se han recogido cada una de las etapas y el flujo de materia que debe seguirse para conseguir un correcto proceso de elaboración.

Las referencias numéricas tienen el siguiente significado:

1. Torta de girasol.
2. Tanque de extracción de proteínas.
3. Solución alcalina.
4. Centrífuga.
5. Fracción soluble.
6. Proteína soluble.
7. Tanque de precipitación.
8. Solución ácida.
9. Centrífuga.
10. Atomizador.
11. Aislado seco.
12. Proteína.
13. Tanque de reacción enzimática.
14. Solución enzimática.
15. Hidrolizado.
16. Clarificador
17. Micro/Ultrafiltración.
18. Atomizador.
19. Hidrolizado comercial.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

En dicho Ejemplo se describe de manera detallada el protocolo empleado para la obtención de un hidrolizado enzimático de proteína vegetal de girasol, con grados de hidrólisis ≥ 50 .

Ejemplo

El fraccionamiento de la harina de girasol (HG) desengrasado es la primera etapa del proceso. Mediante un sistema de torre de flotación/

sedimentación se realiza la separación de la fracción lignocelulósica (FLC), fracción soluble (FS) y fracción proteica (FP). La fracción proteica obtenida en la etapa anterior, se somete en un tanque de tratamiento a un proceso de eliminación de los fenoles presentes por lavado con agua:etanol (90:10). Una vez finalizada esta etapa se lleva a cabo la solubilización de la proteína; para realizar esta solubilización la fracción proteica, libre de polifenoles se extrae en un medio aerobio con una solución alcalina. Esta etapa utiliza un tanque de extracción, con agitación en cabeza, cortacorriente, sistema de adición de reactivos, control de pH y temperatura. Igualmente se utiliza una centrifugadora clarificante y decantadores.

El extracto proteico obtenido en medio aerobio alcalino, es centrifugado y precipitado a su punto isoeléctrico, en un tanque de tratamiento con agitación en cabeza, sistema de adición de ácido y control de pH. Con el procedimiento descrito hasta ahora se consigue la preparación del aislado proteico que se utilizará como sustrato de la Hidrólisis enzimática.

El aislado, en concentraciones adecuadas, se

hidroliza con alcalasa hasta un 12% de hidrólisis y posteriormente se adiciona kersasa y flavourzyme. Los enzimas proteolíticos utilizados son endopeptidasas y exopeptidasas. El grado de hidrólisis (GH) se determina por el método del pH-stato descrito por Adler-Nissen, (1986, Elsevier Appl. Sci. Publi.). El reactor utilizado es de acero inoxidable, con sistemas de agitación, adición de agua y reactivos, así como control de pH, temperatura.

Una vez finalizado el proceso el hidrolizado se pasa a través de un filtro clarificante para eliminar sólidos, en suspensión y microemulsiones. Posteriormente se fracciona por ultrafiltración para obtener péptidos a la medida y finalmente se seca el material obtenido para su conservación.

Balance de materias del proceso total

	Peso inicial	%Proteína	Kg acabado	Y(%)
HG	5.000 Kg	25	1250	100
FP	1.500 Kg	50	750	60
Aislado	650 Kg	90	585	47
Hidrolizado	468 Kg	95	445	36

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de peptonas vegetales de alto grado de hidrólisis, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a) someter el aislado de proteínas vegetales a un proceso de eliminación de polifenoles;

b) (i) someter a un primer tratamiento de hidrólisis el aislado proteínico libre de polifenoles con una o más endoproteasas con actividades inespecíficas hasta conseguir un grado de hidrólisis prácticamente constante del orden del 12-15%.

(ii) someter el producto hidrolizado procedente de la etapa anterior a un segundo tratamiento de hidrólisis con una mezcla de endoproteasas más específicas y exoproteasas hasta alcanzar grados de hidrólisis iguales o superiores al 50%.

c) concentrar y atomizar los hidrolizados obtenidos.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los sustratos vegetales están seleccionados entre girasol, colza, garbanzo, lenteja, lupinus y orujo.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque los enzimas proteolíticos están seleccionados entre alcalasa, kersa, flavourzyme y L-600.

4. Peptonas vegetales o hidrolizados vegetales con un alto grado de hidrólisis, obtenidos por el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 3.

5. Aplicación de las peptonas o hidrolizados vegetales de la reivindicación 4, en la fabricación de productos alimenticios destinados a la nutrición clínica, la nutrición animal y la alimentación infantil.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

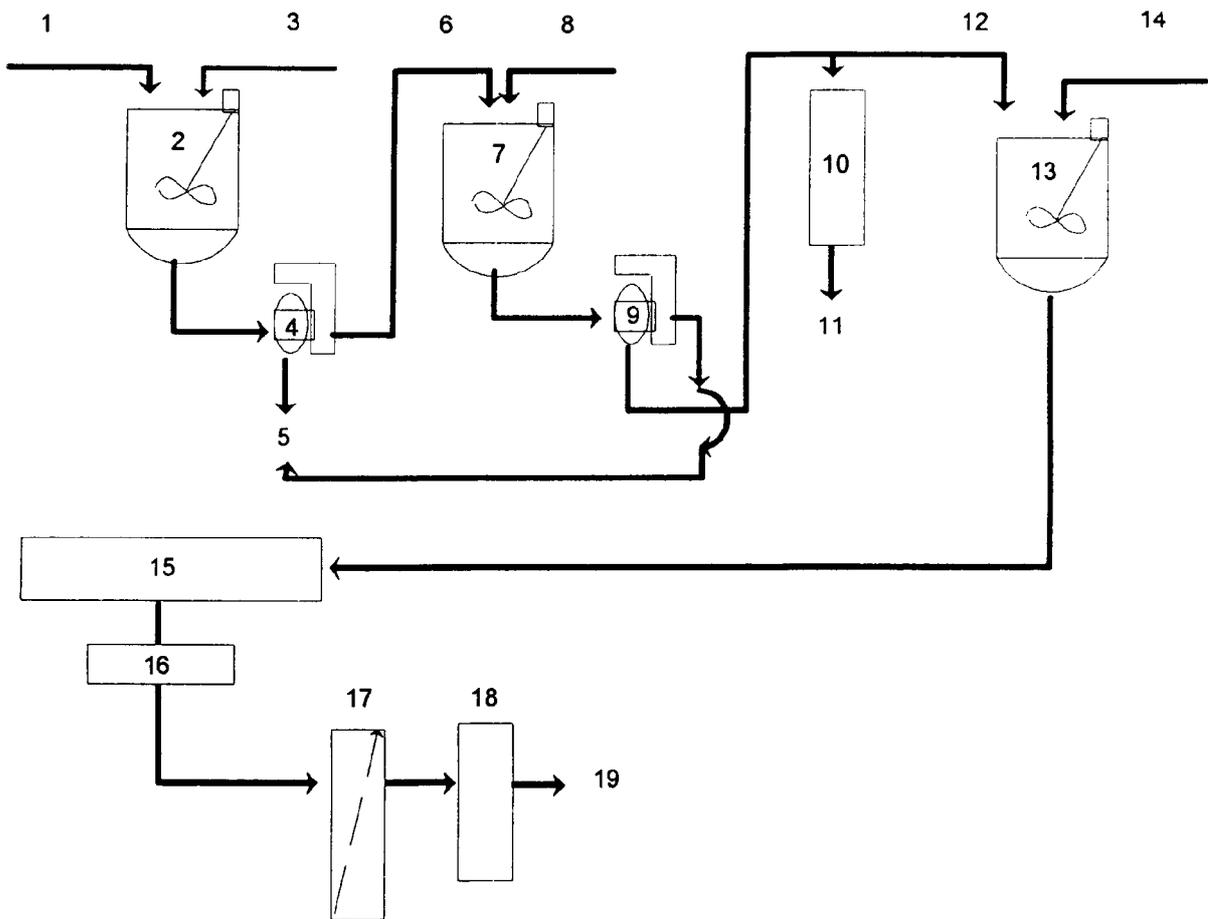


FIGURA UNICA



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 116 937

⑫ N.º solicitud: 9602526

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 29.11.96

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁶: A23J 3/34, 3/14, C07K 1/12, A23L 1/305, A61K 38/01, A23K 1/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WO-9613174-A (NOVO NORDISK A/S) 09.05.96 * Todo el documento *	1-5
Y	PARRADO, J. et al., "Production of soluble enzymatic protein hydrolysate from industrially defatted mon dehulled sunflower meal", 1991, J. Agric. Food Chem., 39, páginas 447-450 * Todo el documento *	1-5
Y	WO-9215697-A (NOVO NORDISK A/S) 17.09.92 * Todo el documento *	1-5
Y	BASE DE DATOS WPIL en QUESTEL, semana 9021, Londres, Derwent Publications Ltd., AN 90-162532 & SU-1500240-A (AS UZB PLANT CHEM) 15.08.89 * Resumen *	1-5
A	WO-9211771-A (NOVO NORDISK A/S) 23.07.92 * Todo el documento *	1-5
A	BAUTISTA, J. et al., "Low molecular weight sunflower protein hydrolysate with low concentration in aromatic amino acids", 1996, J. Agric. Food Chem., 44, páginas 967-971 * Todo el documento *	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

17.06.98

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

① ES 2 116 937

② N.º solicitud: 9602526

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.11.96

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.⁶: A23J 3/34, 3/14, C07K 1/12, A23L 1/305, A61K 38/01, A23K 1/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PARRADO, J. et al., "Characterization of enzymatic sunflower protein hydrolysates", 1993, J. Agric. Food Chem., 41, páginas 1821-1825 * Todo el documento *	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

17.06.98

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

2/2