



INPI
Assinado
Digitalmente

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA INDÚSTRIA, COMÉRCIO EXTERIOR E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 0810149-3

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0810149-3

(22) Data do Depósito: 16/04/2008

(43) Data da Publicação do Pedido: 23/10/2008

(51) Classificação Internacional: A23J 3/34; A23J 1/00

(30) Prioridade Unionista: US 60/911935 de 16/04/2007

(54) Título: MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM HIDROLISADO DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE, E, USO DE UM HIDROLISADO DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE

(73) Titular: NOVOZYMES A/S, Companhia Dinamarquesa. Endereço: Krogshøjvej 36, DK-2880 Bagsvaerd, DINAMARCA(DK)

(72) Inventor: GITTE BUDOLFSEN LYNGLÉV; PER MUNK NIELSEN

Código de Controle: D04D8EEC937C2F83 F5FDBE8DBA5EF163

Prazo de Validade: 10 (dez) anos contados a partir de 02/10/2018, observadas as condições legais

Expedida em: 02/10/2018

Assinado digitalmente por:
Liane Elizabeth Caldeira Lage
Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

“MÉTODO PARA A PRODUÇÃO DE UM HIDROLISADO DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE, E, USO DE UM HIDROLISADO DE PROTEÍNA DE SORO DE LEITE”

CAMPO TÉCNICO

5 A presente invenção diz respeito a um método de produzir um hidrolisado de proteína de soro de leite usando-se uma endopeptidase microbiana.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 Os suplementos de proteína, tais como proteína do soro de leite em pó, são comumente usados por fisiculturistas e outros atletas para acelerar o desenvolvimento muscular e auxiliar na recuperação. Da mesma maneira, tais suplementos de proteína são úteis para a nutrição química. No geral, as proteínas do soro de leites pré-digeridas, parcialmente hidrolisadas são absorvidas mais facilmente do que a proteína não hidrolisada, os
15 hidrolisados de proteína do soro de leite são considerados tendo benefícios nutricionais. Mas visto que a proteína do soro de leite não hidrolisada é suave a levemente leitoso no sabor, a proteína do soro de leite hidrolisada tende ao gosto muito diferente, usualmente de uma maneira que torna-se indesejável. Portanto, quando tais hidrolisados são usados, por exemplo, em bebidas, o
20 sabor deve ser mascarado, por exemplo, pela adição de sabor artificial.

A hidrólise da proteína usando-se endopeptidases específicas é conhecida na técnica, ver, por exemplo, WO97/43910. A hidrólise de beta-lactoglobulina, que é uma das proteínas presentes na proteína do soro de leite, foi estudada em Madsen *et al.* (1997), *Int. Dairy Journal*, 7, pp. 399 a 409. A
25 hidrólise de epítomos de beta-lactoglobulina com proteases diferentes também é descrita em Food Proteins and Their Applications; Ed. S. Damodaran & A. Paraf; Marcel Dekker, New York, 1997; pp. 443-472.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Surpreendentemente, os presente inventores encontraram um

método para a produção de um hidrolisado de proteína de soro de leite, em que a proteína do soro de leite é submetida ao tratamento com uma endopeptidase microbiana tendo especificidade quanto à arginina e lisina, seguido pela inativação da endopeptidase, que dá origem a um hidrolisado tendo um sabor agradável. O hidrolisado ainda pode ter um sabor melhor do que a proteína do soro de leite não hidrolisada. Além disso, o hidrolisado de proteína do soro de leite obtido pelo método da invenção é estável e tem uma tendência reduzida ao gel no tratamento por calor em comparação com os hidrolisados obtidos por outras endopeptidases.

A presente invenção portanto, diz respeito a um método para a produção de um hidrolisado de proteína de soro de leite que compreende:

a) fornecer uma composição aquosa de proteína de soro de leite que compreende beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina;

b) submeter a dita composição à ação de uma endopeptidase microbiana que cliva especificamente no lado do terminal carbóxi de arginina ou lisina e

c) inativar a endopeptidase.

A presente invenção também diz respeito ao uso de um hidrolisado de proteína de soro de leite obtido pelo método acima na nutrição clínica ou em uma bebida energética ou uma bebida esportiva.

DIVULGAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como mencionado acima, a presente invenção diz respeito a um método para a produção de um hidrolisado de proteína de soro de leite que compreende:

a) fornecer uma composição aquosa de proteína de soro de leite que compreende beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina;

b) submeter a dita composição à ação de uma endopeptidase microbiana que cliva especificamente no lado do terminal carbóxi de arginina ou lisina e

c) inativar a endopeptidase.

A proteína do soro de leite a ser usada no método da invenção deve ser entendida como proteínas que podem ser obteníveis a partir do soro de leite, tais como proteínas isoladas da proteína de leite. O soro de leite pode ser definido como a porção líquida que separa-se quando o leite coagula com ácido e/ou coalho. O soro de leite pode ser, desta maneira, um sub-produto da produção de queijo ou da proteína de caseína. O leite no contexto da presente invenção pode ser derivado de qualquer mamífero, tais como vacas, cabras, ovelhas, jumentas, camelas, camelídeos, iaques ou búfalas. Em um aspecto preferido, o leite é leite de vaca.

A proteína do soro de leite a ser usada no método da invenção compreende beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina. Esta também pode compreender outras proteínas obteníveis de soro de leite, tal como albumina de soro. A composição aquosa da etapa a) também pode compreender outras proteínas que não são obteníveis do soro de leite.

Em um aspecto preferido, a composição aquosa da etapa a) compreende pelo menos 15 %, tal como pelo menos 20 %, pelo menos 25 %, pelo menos 30 %, pelo menos 35 %, pelo menos 40 %, pelo menos 45 %, pelo menos 50 %, pelo menos 55 % ou pelo menos 60 % beta-lactoglobulina de matéria seca total. Em um outro aspecto preferido, a composição aquosa da etapa a) compreende pelo menos 5 %, tal como pelo menos 10 %, pelo menos 15 % ou pelo menos 20 % alfa-lactalbumina de matéria seca total. Em um outro aspecto, a composição aquosa da etapa a) compreende pelo menos 1 %, tal como pelo menos 2 %, pelo menos 3 %, pelo menos 4 % ou pelo menos 5 % de albumina de soro de matéria seca total.

Em um outro aspecto preferido, a composição aquosa da etapa a) compreende pelo menos 15 % (p/p), tal como pelo menos 20 % (p/p), pelo menos 25 % (p/p), pelo menos 30 % (p/p), pelo menos 35 % (p/p), pelo menos 40 % (p/p), pelo menos 45 % (p/p), pelo menos 50 % (p/p), pelo

menos 55 % (p/p) ou pelo menos 60 % (p/p) beta-lactoglobulina de proteína total. Em um outro aspecto preferido, a composição aquosa da etapa a) compreende pelo menos 5 % (p/p), tal como pelo menos 10 % (p/p), pelo menos 15 % (p/p) ou pelo menos 20 % (p/p) alfa-lactalbumina de proteína total. Em um outro aspecto, a composição aquosa da etapa a) compreende pelo menos 1 % (p/p), tal como pelo menos 2 % (p/p), pelo menos 3 % (p/p), pelo menos 4 % (p/p) ou pelo menos 5 % (p/p) de albumina de soro de proteína total.

Preferivelmente, a proteína do soro de leite foi isolada do soro de leite e a razão entre beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina é, em essência a mesma como no soro de leite do qual esta foi isolada.

Em uma forma de realização preferida, a proteína do soro de leite usada no método pode ser uma proteína do soro de leite concentrada, que tem um teor de proteína de cerca de 29 % a menos do que cerca de 90 % em uma base isenta de umidade. As proteínas do soro de leite concentradas contém um nível baixo de gordura e de colesterol mas, no geral, tem níveis mais altos de carboidratos na forma de lactose.

Em uma outra forma de realização, a proteína do soro de leite pode ser uma proteína do soro de leite isolada. No geral, as proteínas do soro de leite isoladas têm um teor de proteína de pelo menos cerca de 90 % proteína do soro de leite em uma base isenta de umidade. Tais isolados foram, no geral, processados para remover a gordura e a lactose.

A proteína do soro de leite a ser usada no método da invenção pode ser uma combinação de proteína de soro de leite concentrada e proteína do soro de leite isolada.

A proteína do soro de leite pode compreender proteínas do soro de leite intactas ou pode compreender proteínas do soro de leite parcialmente hidrolisadas.

No método da invenção, o material de proteína do soro de leite

é tipicamente misturado ou dispersado em água para formar uma pasta que compreende cerca de 1 % a cerca de 20 % de proteína em peso. Em uma forma de realização, a pasta pode compreender cerca de 1 % a cerca de 5 % de proteína em peso. Em uma outra forma de realização, a pasta pode compreender cerca de 6 % a cerca de 10 % de proteína em peso. Em uma outra forma de realização, a pasta pode compreender cerca de 11 % a cerca de 15 % de proteína em peso. Ainda, em uma outra forma de realização, a pasta pode compreender cerca de 16 % a cerca de 20 % de proteína em peso.

Após o material de proteína ser dispersado em água, o pH e a temperatura da pasta de proteína podem ser ajustados a fim de otimizar a reação de hidrólise e, em particular, para garantir que a endopeptidase usada na reação de hidrólise funcione próximo de seu nível de atividade ótimo.

O pH da pasta de proteína pode ser ajustado e monitorado de acordo com os métodos, no geral, conhecidos na técnica. O pH da pasta de proteína pode ser ajustado e mantido de cerca de 5,0 a cerca de 10,0. Em uma forma de realização, o pH da pasta de proteína pode ser ajustado e mantido de cerca de 6,5 a cerca de 8,0. Em uma forma de realização preferida, o pH da pasta de proteína pode ser ajustado e mantido em cerca de 7,5. A temperatura da pasta de proteína é preferivelmente ajustada e mantida de cerca de 40° C a cerca de 70° C durante a reação de hidrólise de acordo com os métodos conhecidos na técnica. Em uma forma de realização preferida, a temperatura da pasta de proteína pode ser ajustada e mantida em de cerca de 40° C a cerca de 60° C durante a reação de hidrólise. No geral, as temperaturas acima desta faixa podem inativar a endopeptidase, enquanto temperaturas abaixo ou acima desta faixa tendem a diminuir a atividade da endopeptidase.

A reação de hidrólise é, no geral, iniciada pela adição de uma endopeptidase à pasta de material de proteína.

As endopeptidases a serem usadas no método da invenção clivam especificamente no terminal carbóxi secundário de um resíduo de

arginina ou um resíduo de lisina. Por “clivando-se especificamente” é entendido que a endopeptidase tem uma especificidade mais alta para a clivagem no terminal carbóxi secundário de arginina ou lisina do que para a clivagem no terminal carbóxi secundário de qualquer outro aminoácido. Em

5 uma forma de realização, a endopeptidase especificamente cliva no terminal carbóxi secundário de arginina, significando que a endopeptidase tem uma especificidade mais alta para a clivagem no terminal carbóxi secundário de arginina do que para a clivagem no terminal carbóxi secundário de qualquer outro aminoácido.

10 Tipicamente, a endopeptidase tem atividade proteolítica ótima em um pH de cerca de 6,0 a cerca de 11,0, preferivelmente em um pH de cerca de 8 a cerca de 10 e em uma temperatura de cerca de 40° C a cerca de 70° C, preferivelmente em uma temperatura de cerca de 45° C a cerca de 60° C ou de cerca de 45° C a cerca de 55° C.

15 Uma endopeptidase a ser usada no método da invenção é de origem microbiana. O uso de enzimas microbianas, em vez de enzimas animais ou vegetais, é vantajoso em que as enzimas microbianas apresentam um amplo espectro de características (pH ótimo, temperatura etc.) e pode ser consistentemente obtível em quantidades relativamente grandes.

20 A endopeptidase é, preferivelmente, uma endopeptidase semelhante à tripsina de origem microbiana. No contexto da presente invenção, uma endopeptidase semelhante à tripsina é uma endopeptidase tendo uma especificidade similar àquela de tripsina, por exemplo, uma endopeptidase tendo uma razão de tripsina maior do que 100, em que a razão

25 de tripsina é determinada como a atividade da enzima quando cliva-se após Arg ou Lys (seja qual for o maior) dividido pela atividade da enzima quando cliva-se após qualquer outro aminoácido. Tais medições de atividade para determinar a razão de tripsina devem ser realizadas em um valor de pH onde a atividade da endopeptidase é pelo menos metade da atividade da

endopeptidase em seu pH ótimo. A taxa de tripsina pode ser determinada como descrito no Exemplo 3 do presente pedido.

Em uma forma de realização, a endopeptidase é uma endopeptidase bacteriana.

5 Em uma outra forma de realização, a endopeptidase é uma endopeptidase fúngica. Em uma forma de realização preferida, a endopeptidase é de uma cepa de *Fusarium*, preferivelmente *Fusarium oxysporum*, por exemplo, tendo a sequência de aminoácido mostrada como SEQ ID N°: 2 do presente pedido (SWISSPROT N° P35049). Uma
10 endopeptidase semelhante à tripsina de *Fusarium oxysporum* tendo a sequência de aminoácido mostrada como aminoácidos 25 a 248 da SEQ ID N°: 2 foi previamente descrita (US 5.288.627; US 5.693.520).

Em uma forma de realização, a endopeptidase é uma endopeptidase semelhante à tripsina de *Achromobacter lyticus*, por exemplo,
15 tendo a sequência de aminoácido mostrada como SEQ ID N°: 4 do presente pedido (UNIPROT:P15636). Em uma outra forma de realização, a endopeptidase é uma endopeptidase semelhante à tripsina de *Fusarium solani*, por exemplo, AP977S tendo a sequência de aminoácido mostrada como a SEQ ID N°: 6 do presente pedido (GENESEQP: ADZ80577). Em uma outra
20 forma de realização, a endopeptidase é uma endopeptidase semelhante à tripsina de *Fusarium cf. solani*, por exemplo, AP971 tendo a sequência de aminoácido mostrada como a SEQ ID N°: 8 do presente pedido.

Em uma forma de realização da invenção, a endopeptidase é selecionada do grupo que consiste de:

25 i) um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 98 % idêntica a (A) qualquer um de SEQ ID N°: 2, 4, 6 ou 8 ou (B) um fragmento de qualquer uma destas sequências tendo a atividade de protease;

ii) um polipeptídeo que é codificado por um polinucleotídeo

que é pelo menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 98 % idêntica a qualquer um de SEQ ID N°: 1, 3, 5 ou 7;

5 iii) um polipeptídeo que é codificado por um polinucleotídeo cujo complemento hibridiza-se pelo menos sob condições de estringência baixas, preferivelmente, pelo menos estringência média, pelo menos estringência alta ou pelo menos condições de estringência muito altas, com qualquer um de SEQ ID N°: 1, 3, 5 ou 7 e

10 iv) um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácido modificada por substituição, deleção e/ou inserção de um ou diversos aminoácidos em (A) qualquer um de SEQ ID N°: 2, 4, 6 ou 8 ou (B) um fragmento de qualquer uma destas sequências tendo a atividade de protease.

15 Um fragmento de uma sequência de aminoácido tendo a atividade de protease pode ser a sequência de aminoácido da enzima ativa, por exemplo, após o processamento, tal como após qualquer peptídeo e/ou propeptídeo sinalizador ser clivado. Os fragmentos preferidos são os aminoácidos 25-248 da SEQ ID N°: 2, aminoácidos 21-653 da SEQ ID N°: 4, aminoácidos 26-251 de SEQ ID N°: 6 ou aminoácidos 18-250 da SEQ ID N°: 8.

20 Em uma forma de realização preferida da invenção, a endopeptidase tem uma sequência de aminoácido que é pelo menos 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % ou 98 % idêntica aos aminoácidos 25-248 da SEQ ID N°: 2.

25 Condições de estringência muito baixas a muito altas são definidas como pré-hibridização e hibridização a 42° C em 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microg/ml de DNA de esperma de salmão cortado e desnaturado e 25 % de formamida para condições de estringência muito baixa e de estringências baixas, 35 % de formamida para estringências médias e média-altas ou 50 % de formamida para estringências altas e muito altas, seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão para 12 a 24 horas otimamente. O

material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando-se 2X SSC, 0,2 % de SDS preferivelmente pelo menos a 45° C (estringência muito baixa), mais preferivelmente pelo menos a 50° C (estringência baixa), mais preferivelmente pelo menos a 55° C (estringência média), mais preferivelmente pelo menos a 60° C (estringência média-alta), ainda mais preferivelmente pelo menos a 65° C (estringência alta) e mais preferivelmente pelo menos a 70° C (estringência muito alta). Em uma forma de realização particular, a lavagem é conduzida usando-se 0,2X SSC, 0,2 % de SDS preferivelmente pelo menos a 45° C (estringência muito baixa), mais preferivelmente pelo menos a 50° C (estringência baixa), mais preferivelmente pelo menos a 55° C (estringência média), mais preferivelmente pelo menos a 60° C (estringência média-alta), ainda mais preferivelmente pelo menos a 65° C (estringência alta) e mais preferivelmente pelo menos a 70° C (estringência muito alta). Em uma outra forma de realização particular, a lavagem é conduzida usando-se 0,1X SSC, 0,2 % de SDS preferivelmente pelo menos a 45° C (estringência muito baixa), mais preferivelmente pelo menos a 50° C (estringência baixa), mais preferivelmente pelo menos a 55° C (estringência média), mais preferivelmente pelo menos a 60° C (estringência média-alta), ainda mais preferivelmente pelo menos a 65° C (estringência alta) e mais preferivelmente pelo menos a 70° C (estringência muito alta).

Para os propósitos da presente invenção, o alinhamento de duas sequências de aminoácidos podem ser determinado pelo uso do programa Needle a partir da embalagem EMBOSS (Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. Trends in Genetics 16, (6) pp 276—277; <http://emboss.org>) versão 2.8.0. O programa Needle executa o algoritmo de alinhamento global descrito em Needleman, S. B. and Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453. A matriz de substituição usada é BLOSUM62, penalidade de

abertura de fenda é de 10, e a penalidade de extensão de fenda é de 0,5.

O grau de identidade entre duas sequências de aminoácidos é calculada como o número de pontos exatos em um alinhamento de duas sequências, dividido pelo comprimento de duas sequências mais curtas. O resultado é expressado na identidade de percentual. Um ponto exato ocorre quando as duas sequências tem resíduos de aminoácidos idênticos na mesma posição da sobreposição. O comprimento da sequência é o número de resíduos de aminoácidos na sequência (por exemplo o comprimento da SEQ ID N°: 2 é de 248 aminoácidos).

O grau de identidade entre duas sequências de nucleotídeos é determinado pelo método Wilbur-Lipman (Wilbur and Lipman, 1983, Proceedings of the National Academy of Science USA 80: 726-730) usando o software LASERGENE™ MEGALIGN™ (DNASTAR, Inc., Madison, WI) com uma tabela de identidade e os seguintes parâmetros de alinhamento múltiplos: Penalidade de fenda de 10 e penalidade de comprimento de fenda de 10. Os parâmetros de alinhamento em forma de pares são *Ktuple*=3, penalidade de fenda=3 e *windows*=20.

O grau de identidade entre as sequências de nucleotídeos é calculada como o número de pontos exatos em um alinhamento de duas sequências, dividido pelo comprimento de duas sequências mais curtas. O resultado é expressado na identidade de percentual. Um ponto exato ocorre quando as duas sequências tem nucleotídeos idênticos na mesma posição da sobreposição. O comprimento da sequência é o número de nucleotídeos na sequência (por exemplo o comprimento da SEQ ID N°: 1 é de 744 nucleotídeos).

Preferivelmente, a quantidade de endopeptidase microbiana usada no método da invenção é de cerca de 0,01 a cerca de 500 AU (como definido abaixo) por Kg da proteína do soro de leite, preferivelmente de cerca de 0,1 a cerca de 100 AU por Kg da proteína do soro de leite, mais

preferivelmente de cerca de 0,5 a cerca de 50 AU por Kg da proteína do soro de leite.

Uma unidade Anson (AU) é definida como uma quantidade de enzima que está sob condições padrão (isto é 25° C, pH 7.5 e 10 minutos. período de reação) digerindo a hemoglobina em uma taxa inicial tal que aqui é liberada por minuto em uma quantidade do produto solúvel em TCA que dá a mesma cor com o reagente fenol como um miliequivalente de tirosina.

A quantidade de endopeptidase adicionado ao material de proteína pode e variará dependendo da fonte do material de proteína, o grau desejado de hidrólise e a duração da reação de hidrólise. A quantidade de endopeptidase pode variar de cerca de 1 mg da proteína da enzima a cerca de 5000 mg da proteína da enzima por quilograma do material de proteína. Em uma outra forma de realização, a quantidade pode variar de 10 mg da proteína da enzima a cerca de 2000 mg da proteína da enzima por quilograma do material de proteína. Já em uma outra forma de realização, a quantidade pode variar de cerca de 50 mg da proteína da enzima a cerca de 1000 mg da proteína da enzima por quilograma do material de proteína.

Como será apreciado por um técnico habilitado, a duração da reação de hidrólise pode e variará. No geral, a duração da reação de hidrólise pode variar de poucos minutos a muitas horas, tal como, de cerca de 30 minutos a cerca de 48 horas.

Preferivelmente, o tratamento com endopeptidase microbiana resulta em um hidrolisado de proteína do soro de leite tendo um grau de hidrólise (DH) de cerca de 0,1 % a cerca de 20 %, mais preferivelmente de cerca de 0,5 % a cerca de 10 % ou de cerca de 0,5 % a cerca de 8 %, ainda mais preferivelmente de cerca de 1 % a cerca de 5 %.

O grau de hidrólise (DH) expressa a extensão da hidrólise da proteína obtida pelo método. No contexto da invenção, o grau de hidrólise (DH) é definido como segue:

$$DH = (\text{Número de ligações de peptídeo clivadas} / \text{Número total de ligações de peptídeos}) \times 100 \%$$

A pessoa habilitada conhecerá para medir o DH.

Na etapa c) do método da invenção, a endopeptidase é inativada. Tal inativação pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo pelo aquecimento a pelo menos 70° C, tal como a pelo menos 75° C ou pelo menos 80° C.

Um hidrolisado da proteína do soro de leite obtido pelo método da invenção pode ser usada em um produto alimentício, por exemplo em uma bebida. Exemplos não limitantes de tais produtos alimentícios incluem bebidas esportivas ou bebidas energéticas. Um hidrolisado da proteína do soro de leite obtido pelo método da invenção também pode ser usado na nutrição clínica, por exemplo em hospitais.

EXEMPLO 1

Cinco enzimas proteolíticas diferentes foram usadas para hidrolisar o concentrado da proteína do soro de leite (Lacprodan 80) de Arla Foods, Denmark (que compreende cerca de 80 % da proteína do total da origem seca). As enzimas e dosagens foram:

Protease semelhante à tripsina de *Fusarium oxysporum*, dosagem de 500 mg da proteína da enzima/kg material bruto.

PTN 6.0 (Novozymes A/S), dosagem de 0,5 % do material bruto.

Alcalase 2.4L (Novozymes A/S), dosagem de 0,2 % do material bruto.

Neutrase 0.8L (Novozymes A/S), dosagem de 1 % do material bruto.

Protamex 1.5MG (Novozymes A/S), dosagem de 0,5 % do material bruto.

O concentrado da proteína do soro de leite foi misturado com

água (1:9) antes da adição da enzima.

A hidrólise foi colocada a 50° C em um béquer montado com o sistema de dosagem de adição da base (0,1 N de NaOH) para manter o pH constante a pH 7.5 até o grau da hidrólise (DH) = 4 %.

5 As amostras foram aquecidas a 85° C para inativar as enzimas e testar no painel sensorial.

Os testes triangulares foram usados para comparar o hidrolisado obtido com a protease microbiana semelhante à tripsina com cada um do hidrolisado obtido com um outro de quatro enzimas. Seis participantes, cada um recebeu três amostras codificadas. Estes relataram que duas das amostras foram as mesmas que uma foi diferente. Os participantes foram indagados para identificar a amostra ímpar. O número de “respostas corretas” na tabela abaixo indica o número de participantes que são capazes de identificar a amostra ímpar. Os participantes também foram indagados por selecionar o mínimo da amargura das amostras em cada teste triangular.

As amostras feitas com Alcalase, Neutrase e Protamex todas tem uma clara tendência ao gel durante a pasteurização. As amostras feitas com PTN e protease microbiana semelhante à tripsina ficaram homogêneas.

20 As amostras foram diluídas a 3 % do conteúdo da proteína antes da avaliação do paladar.

Os resultados a partir das avaliações do paladar triangular são mostradas abaixo. MTP é a protease microbiana experimental semelhante à tripsina de *Fusarium oxysporum*. Seis participantes foram incluídos na avaliação. Se pelo menos 5 respostas corretas foram dadas (coluna 2), a diferença entre as amostras foi considerada significativa. A terceira e quarta colunas são os números de participantes (com respostas corretas na segunda coluna) que observaram que as amostras tem a mínimo de amargura no paladar:

	Respostas corretas	Mínimo de amargura	
Processo 1, PTN	5	PTN	MTP
		2	3
Processo 2, Alcalase	4	Alcalase	MTP
			2
Processo 3, Neutrase	2	Neutrase	MTP
		1	
Processo 4, Protamex	3	Protamex	MTP
		2	1

Os resultados mostram que existe uma diferença significativa entre as amostras produzidas por PTN e por MTP onde as amostras produzidas por MTP foram selecionadas como sendo o mínimo de amargura do que as amostras produzidas por PTN. Nenhuma diferença significativa foi mostrada entre as amostras produzidas por MTP e qualquer uma das amostras produzidas com as enzimas não tendo a especificidade Lys e Arg (Alcalase, Neutrase, Protamex).

EXEMPLO 2

Cinco enzimas proteolíticas diferentes foram usadas para hidrolisar o concentrado da proteína do soro de leite de Leprino Foods, US (que compreende cerca de 80 % da proteína do total da origem seca). As enzimas e dosagens foram:

Protease semelhante à tripsina de *Fusarium oxysporum*, dosagem de 500 mg da proteína da enzima/kg do material bruto.

PTN 6.0 (Novozymes A/S), dosagem de 0,5 % do material bruto.

Alcalase 2.4L (Novozymes A/S), dosagem de 0,2 % do material bruto.

Neutrase 0.8L (Novozymes A/S), dosagem de 1 % do material bruto.

Protamex 1.5MG (Novozymes A/S), dosagem de 0,5 % do material bruto.

O concentrado da proteína do soro de leite foi misturado com

água (1:9) antes da adição da enzima.

A hidrólise foi colocada a 50° C em um béquer montado com o sistema de dosagem de adição da base (0,1 N de NaOH) para manter o pH constante a pH 7.5 até o grau da hidrólise (DH) = 4 %.

5 As amostras foram aquecidas a 85° C para inativar as enzimas e testar no painel sensorial.

Os testes triangulares foram usados para comparar o hidrolisado obtido com a protease microbiana semelhante à tripsina com cada um do hidrolisado obtido com um outro de quatro enzimas. Sete participantes
10 cada um recebeu três amostras codificadas. Estes relataram que duas das amostras foram a mesma e que uma foi diferente. Os participantes foram indagados para identificar a amostra ímpar. O número de “respostas corretas” na tabela abaixo indica o número de participantes que são capazes de identificar a amostra ímpar. Os participantes também foram indagados por
15 selecionar o mínimo da amargura das amostras em cada teste triangular.

Todas as amostras ficaram homogêneas durante/após a pasteurização.

As amostras foram diluídas a 3 % do conteúdo da proteína antes da avaliação do paladar.

20 Os resultados a partir das avaliações do paladar triangular são mostrados abaixo. MTP é a protease microbiana experimental semelhante à tripsina de *Fusarium oxysporum*. Sete participantes foram incluídos na avaliação. Se pelo menos 5 respostas corretas foram dadas (coluna 2), a diferença entre as amostras foi considerada significativa. A terceira e quarta
25 colunas são os números de participantes (com respostas corretas na segunda coluna) que observaram que as amostras tem um mínimo de amargura no paladar:

	Respostas corretas	Mínimo de amargura	
		PTN	MTP
Processo 1, PTN	5		4
Processo 2, Alcalase	6	Alcalase	MTP
			4
Processo 3, Neutrase	2	Neutrase	MTP
			2
Processo 4, Protamex	3	Protamex	MTP
		3	

Os resultados mostram que existe uma diferença significativa entre as amostras produzidas com MTP e as amostras produzidas com Alcalase ou PTN onde as amostras produzidas por MTP foram selecionadas como sendo o mínimo de amargura do que as amostras produzidas tanto por Alcalase quando por PTN.

EXEMPLO 3

Definição, medição e cálculo da razão de Tripsina

Princípio

Para fazer um ensaio medido para a determinação da atividade de endopeptidase semelhante à tripsina, temos usados 10 substratos cromogênicos diferentes com a fórmula geral Suc-AAPX-pNA – onde X é uma abreviação da letra por um dos vinte resíduos de aminoácidos naturais. A endopeptidase clivará no lado do terminal carbóxi de X e libera uma cor amarela (para-nitroanilina), que pode ser medida. Temos usados estes 10 substratos Suc-AAPX-pNA diferentes disponíveis de Bachem (X = A, R, D, E, I, L, K, M, F e V) para fazer a medição e cálculo de que intitulamos a razão de tripsina.

Uma endopeptidase semelhante à tripsina no contexto da presente invenção pode ser definido como uma endopeptidase tendo uma razão de tripsina de mais do que 100.

A razão de tripsina é calculada como a atividade máxima em Suc-AAPR-pNA ou Suc-AAPK-pNA dividida pela atividade máxima em quaisquer um dos oito outros substratos Suc-AAPX-pNA:

Razão de tripsina = atividade máxima em Suc-AAP(R/K)-pNA
/ atividade máxima em Suc-AAP(nonR/K)-pNA.

A medição da atividade deve ser realizada em um valor pH onde a atividade é pelo menos metade da atividade em ótimo pH.

5 Materiais e Métodos

Ensaio Suc-AAPX-pNA:

Substratos: Suc-AAPA-pNA (Bachem L-1775)

Suc-AAPR-pNA (Bachem L-1720)

Suc-AAPD-pNA (Bachem L-1835)

10 Suc-AAPE-pNA (Bachem L-1710)

Suc-AAPI-pNA (Bachem L-1790)

Suc-AAPL-pNA (Bachem L-1390)

Suc-AAPK-pNA (Bachem L-1725)

Suc-AAPM-pNA (Bachem L-1395)

15 Suc-AAPF-pNA (Bachem L-1400)

Suc-AAPV-pNA (Bachem L-1770)

Temperatura: Temperatura ambiente (25° C)

Tampão de ensaio: 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0,01 % de
20 Triton X-100, pH 9.0.

Ensaio: 20 ul (microlitro) da diluição de peptidase (diluído em 0,01 % de Triton X-100) foi colocado em um reservatório em uma placa microtituladora. O ensaio foi começado pela adição 200 ul de substrato de pNA (50 mg dissolvido em 1,0 ml de DMSO e ainda diluído com 90x no tampão de ensaio). O aumento inicial em OD₄₀₅ foi monitorado como uma medida da atividade de peptidase. Se uma plotagem linear (ou quase linear) não for atingida nos 4 minutos do período de medição, a peptidase ainda será diluída e o ensaio será repetido.

25

Peptidases: Alcalase (Novozymes A/S, Denmark)

Endopeptidase de lisila de *Achromobacter lyticus* (SEQ ID N°: 4)

Protease semelhante à tripsina de *Fusarium oxysporum*

5 Tripsina porcina (Novozymes A/S, Denmark)

Todas as enzimas foram purificadas pela cromatografia a uma alta pureza. Apenas um grupo foi visto para cada peptidase em *coomassie* tingidos pelos géis SDS-PAGE.

Características da peptidase:

10 Alcalase: $pH_{opt} = pH\ 9$ em Suc-AAPF-pNA.

Protease de *Achromobacter lyticus*: $pH_{opt} = pH\ 10$ em Suc-AAPK-pNA.

Protease semelhante à tripsina de *Fusarium*: $pH_{opt} = pH\ 10$ em Boc-VLGR-pNA.

15 Tripsina porcina: $pH_{opt} = pH\ 10$ em Boc-VLGR-pNA.

Resultados

A especificidade das peptidases em substratos Suc-AAPX-pNA no pH 9 e cálculo de uma razão de tripsina:

20 O experimento da especificidade foi realizado ao pH 9. Como é visto no parágrafo de Materiais e métodos, três das peptidases testadas tem $pH_{opt} > pH\ 9$. Entretanto, para estas três peptidases a atividade no pH 9 é mais do que metade da atividade no pH_{opt} . Os resultados são mostrados na Tabela abaixo:

Suc-AAPX-pNA	Alcalase	Protease de <i>Achromobacter lyticus</i>	Tripsina de <i>Fusarium</i>	Tripsina porcina
Suc-AAPA-pNA	0,02497	0,00001	0,00000	0,00001
Suc-AAPR-pNA	0,01182	0,00001	1,00000	1,00000
Suc-AAPD-pNA	0,00053	0,00000	0,00000	0,00000
Suc-AAPI-pNA	0,00026	0,00000	0,00000	0,00000

Suc-AAPM-pNA	0,37582	0,00023	0,00002	0,00031
Suc-AAPV-pNA	0,00033	0,00000	0,00000	0,00000
Suc-AAPL-pNA	0,86502	0,00001	0,00000	0,00002
Suc-AAPE-pNA	0,00289	0,00000	0,00000	0,00000
Suc-AAPK-pNA	0,01900	1,00000	0,53071	0,51396
Suc-AAPF-pNA	1,00000	0,00001	0,00003	0,00057
Max de Suc-AAP(R/K)-pNA	0,01900	1,00000	1,00000	1,00000
Max de Suc-AAP(nonR/K)-pNA	1,00000	0,00023	0,00003	0,00057
Razão de tripsina	0,019	4300	33000	1750

Os dados da atividade relatada para cada endopeptidase na Tabela é relacionada à atividade para o melhor substrato Suc-AAPX-pNA.

É visto que de acordo com esta definição, a protease de *Achromobacter lyticus*, a protease de *Fusarium* semelhante à tripsina e tripsina porcina são endopeptidases semelhantes à tripsina. Considerando a Alcalase não é uma endopeptidase semelhante à tripsina.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a produção de um hidrolisado de proteína de soro de leite, caracterizado pelo fato de que compreende:

a) fornecer uma composição aquosa de proteína de soro de leite que compreende beta-lactoglobulina e alfa-lactalbumina;

b) submeter a dita composição à ação de uma endopeptidase microbiana que cliva especificamente no lado do terminal carbóxi de arginina ou lisina e

c) inativar a endopeptidase.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase microbiana é uma endopeptidase fúngica.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase fúngica é derivada de uma cepa de *Fusarium*.

4. Método de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase fúngica é derivada de uma cepa de *Fusarium oxysporum*.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase tem atividade proteolítica ótima em um pH de 8 a 10.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase tem atividade proteolítica ótima em uma temperatura de 45° C a 60° C.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase tem uma sequência de aminoácido que é idêntica aos aminoácidos 25 a 248 de SEQ ID NO: 2.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a proteína do soro de leite é a proteína do soro de leite concentrada ou proteína do soro de leite isolada.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a solução aquosa de proteína de soro de leite compreende pelo menos 5 % de alfa-lactalbumina de matéria seca total.

5 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o hidrolisado de proteína do soro de leite tem um grau de hidrólise de 0,1 % a 20 %.

10 11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que o hidrolisado de proteína do soro de leite tem um grau de hidrólise de 0,5 % a 8 %.

12. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a etapa c) compreende aquecimento a pelo menos 70° C.

15 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase é adicionada em uma concentração de 0,01 a 10 g de proteína de enzima por kg proteína do soro de leite.

20 14. Uso de um hidrolisado de proteína de soro de leite obtido pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de ser na nutrição clínica.

15. Uso de um hidrolisado de proteína de soro de leite obtido pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 13, caracterizado pelo fato de ser em uma bebida esportiva.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 8861791491.txt
- Data de Geração do Código: 21/03/2018
- Hora de Geração do Código: 12:19:13
- Código de Controle:
 - Campo 1: D04D8EEC937C2F83
 - Campo 2: F5FDBE8DBA5EF163