



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0913178-7 B1



* B R F I O 9 1 3 1 7 8 B 1 *

(22) Data do Depósito: 29/05/2009

(45) Data de Concessão: 19/05/2020

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUZIR UM HIDROLISADO DE CASEÍNA, E, USO DE UM HIDROLISADO DE CASEÍNA

(51) Int.Cl.: C12N 9/52; A23J 3/34.

(30) Prioridade Unionista: 03/06/2008 EP 08157453.5.

(73) Titular(es): NOVOZYMES A/S.

(72) Inventor(es): GITTE B. LYNGLÉV; PER MUNK NIELSEN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2009056644 de 29/05/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/147105 de 10/12/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/11/2010

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUZIR UM HIDROLISADO DE CASEÍNA, E, USO DE UM HIDROLISADO DE CASEÍNA A presente invenção diz respeito a um método para produzir um hidrolisado de caseína usando-se uma endopeptidase microbiana.

“MÉTODO PARA PRODUZIR UM HIDROLISADO DE CASEÍNA, E, USO DE UM HIDROLISADO DE CASEÍNA”

REFERÊNCIA A UMA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

Este pedido contém uma listagem de sequência em uma forma legível em computador. A forma legível em computador é incorporada neste por referência.

CAMPO TÉCNICO

A presente invenção diz respeito a um método par a produção de um hidrolisado de caseína usando-se uma endopeptidase microbiana.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os hidrolisados de caseína são usados para a fortificação de proteína, por exemplo, em bebidas esportivas e em outras bebidas dietéticas, bebidas combinadas secas, barras nutricionais, fórmulas infantis, etc. Os hidrolisados de caseína têm, foram, em alguns casos, observados serem menos alergênicos do que os hidrolisados de proteína de soro de leite que os tornam potencialmente mais úteis em, por exemplo, fórmula infantil. Os hidrolisados de caseína podem ser fabricados usando-se as enzimas proteolíticas para hidrolisar a caseína. Na fabricação industrial de hidrolisados de caseína, solubilidade ou suspensibilidade alta da proteína hidrolisada são importantes tanto a partir de um ponto de vista de processamento, quanto a partir de um ponto de vista de rendimento/econômico puro e por causa de atributos de impressão sensorial deixada pelo alimento na boca e sensoriais. Portanto, foi um objetivo para os presente inventores identificar enzimas proteolíticas que são úteis para a preparação de hidrolisados de caseína tendo uma solubilidade alta, tal como uma solubilidade alta, em pH baixo e/ou uma solubilidade alta em grau baixo ou moderado de hidrólise.

As endopeptidases observadas serem aplicáveis de acordo com a presente invenção foram previamente descritas. Por exemplo, a

endopeptidase derivada de *Nocardiosis* sp. O NRRL 18262 é divulgado no WO88/03947 (aqui, a cepa é referida como *Nocardiosis* sp. cepa 10R) e WO01/58276. Outras endopeptidases relacionadas que são úteis de acordo com a invenção são divulgados no WO88/03947, WO04/111220, 5 WO04/111222, WO04/111223, WO05/123911 e WO04/072279.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os presentes inventores identificaram endopeptidases que são observadas serem aplicáveis na fabricação de caseína tendo uma solubilidade alta a dando suspensões uniformes. Tais endopeptidases são mais 10 funcionalmente eficientes do que outras endopeptidases usadas na técnica quando comparado com uma quantidade igual de proteína de enzima, que resulta em economia de produto melhor para os produtores de hidrolisados caseína. Conseqüentemente, a presente invenção diz respeito a um método para produzir um hidrolisado de caseína, que compreende: a) adicionar a uma 15 composição que compreende caseína, uma endopeptidase tendo pelo menos 50 % de identidade para a SEQ ID N°: 1 e b) incubação a fim de hidrolisar a caseína.

DIVULGAÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Endopeptidase

20 O termo endopeptidase como usado neste é uma enzima que hidrolisa ligações de peptídeo internas (tem atividade de endopeptidase).

Não existem limitações na origem da endopeptidase para o uso de acordo com a invenção. Desta maneira, o termo endopeptidase inclui não apenas endopeptidase naturais ou do tipo selvagem, mas também quaisquer 25 mutantes, variantes, fragmentos etc. destes que apresentam atividade de endopeptidase, bem como endopeptidases sintéticas, tais como endopeptidases embaralhadas. Variantes de endopeptidases geneticamente projetadas podem ser preparadas como, em geral, é conhecido na técnica, por exemplo, pela mutagênese direcionada ao local, por PCR (usando-se um

fragmento de PCR contendo a mutação desejada como um dos iniciadores nas reações de PCR) ou pela mutagênese aleatória. Os exemplos de variantes de endopeptidase, como usado no presente contexto, são endopeptidases em que um ou mais aminoácidos foram anulados, inseridos ou substituídos por outros aminoácidos.

Exemplos de endopeptidases para o uso de acordo com a invenção são as

(i) endopeptidases derivadas de *Nocardiosis* sp. NRRL 18262, divulgado no WO01/58276, a sequência de que é mostrado como a SEQ ID N°: 1 do presente documento;

(ii) endopeptidases tendo pelo menos 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, ou pelo menos 95 % de identidade de aminoácido a endopeptidase de (i);

(iii) mutantes, variantes ou fragmentos endopeptidases de (i) ou (ii) que exibe a atividade de endopeptidase.

Para os propósitos da presente invenção, o alinhamento das sequências de aminoácido podem se determinadas pelo uso do programa Needle do pacote EMBOSS (<http://emboss.org>) versão 2.8.0. O programa Needle implementa 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 10 e penalidade de extensão de fenda é de 0,5.

O grau de identidade entre duas sequências de aminoácido é calculado como o número de pontos exatos em um alinhamento de duas sequências, divididas pelo comprimento dos mais curtos de duas sequências. O resultado é expresso na identidade de percentual.

Um ponto exato ocorre quando as duas sequências tem resíduos de aminoácidos idênticos na mesma posição de sobreposição. O comprimento de uma sequência é um número de resíduos de aminoácidos na

sequência (por exemplo o comprimento da SEQ ID N°: 1 é 188).

Como exemplos de endopeptidases bacterianas aplicáveis para o uso de acordo com a invenção também podem ser mencionadas a endopeptidase de *Nocardiosis alba* (previamente *Nocardiosis dassonvillei*) NRRL 18133 divulgado em WO88/03947, a endopeptidases de *Nocardiosis dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43235, *Nocardiosis alba* DSM 15647, *Nocardiosis* sp. DSM 16424 e a Protease 22 sintética, todas as quatro divulgadas em W004/111220, a endopeptidase de *Nocardiosis prasina* DSM 15648 divulgada em WO04/111222, a endopeptidase de *Nocardiosis prasina* DSM 15649 divulgada em W004/111223, as endopeptidases de *Nocardiosis prasina* (previamente *Nocardiosis alba*) DSM 14010, *Nocardiosis alkaliphila* DSM 44657 e *Nocardiosis /ucentensis* DSM 44048, todos as três divulgadas no WO05/123911, a endopeptidases de *Brachysporiella gayana* CGMCC 0865, *Metarhizium anisopliae*, *Gliocladium* sp. CBS 114001, *Periconia* sp. CBS 114002, *Periconia* sp. CBS 114000 e *Curvularia lunata* CBS 114003, todos 6 divulgados em WO04/072279, e mutantes, variantes ou fragmentos de qualquer um destes que exibem a atividade de endopeptidase.

Uma endopeptidase para o uso de acordo com a invenção é uma endopeptidase microbiana, preferivelmente uma endopeptidase bacteriana, o termo bacteriana que indica que a endopeptidase é derivada de, ou originada de, uma bactéria, ou é um análogo, um fragmento, uma variante, um mutante, ou uma endopeptidase sintética derivada de uma bactéria. Este pode ser produzido ou expressado na cepa bacteriana de tipo selvagem original, uma outra cepa microbiana, ou em uma planta; isto é o termo cobre a expressão da endopeptidase de ocorrência natural, de tipo selvagem, bem como a expressão em qualquer hospedeiro de endopeptidase sintética, geneticamente projetada ou recombinante.

No processo da invenção, a endopeptidase pode ser purificada. O termo "purificada" como usado neste cobre as preparações de proteína de

enzima onde a preparação foi enriquecida para a proteína de enzima em questão. Tal enriquecimento deve ser por exemplo: a remoção das células do organismo de que uma proteína de enzima extracelular foi produzida, a remoção do material de não proteína por uma precipitação específica de proteína ou o uso de um procedimento cromatográfico onde a proteína de enzima em questão é seletivamente eluída a partir de uma matriz cromatográfica. A endopeptidase pode ser purificada a uma extensão deste modo que apenas quantidades menores de outras proteínas estão presentes. A expressão "outras proteínas" relatam em particular a outras enzimas. Uma endopeptidase a ser usada no método da invenção pode ser "substancialmente pura", isto é substancialmente livre de outros componentes a partir do organismo em que foi produzido, que pode ser um microorganismo de ocorrência natural ou um microorganismo hospedeiro geneticamente modificado para a produção recombinante da endopeptidase.

Entretanto, para os usos de acordo com a invenção, a endopeptidase não necessita ser pura. Esta pode, por exemplo, incluir a outras enzimas, ainda outras endopeptidases.

Em um aspecto preferido, a endopeptidase a ser usada no método da invenção foi purificada por conter pelo menos 20 %, preferivelmente pelo menos 30 %, pelo menos 40 % ou pelo menos 50 %, (p/p) da endopeptidase em questão da proteína total. A quantidade da endopeptidase pode ser calculada a partir da medição da atividade da preparação dividida da atividade específica da endopeptidase (atividade/mg EP), ou pode ser quantificado por SDS-PAGE ou qualquer outro método conhecido na técnica. A quantidade da proteína total pode ser, por exemplo, medida pela análise de aminoácido.

O uso de endopeptidase de acordo com a presente invenção pode ser combinado com o uso de outras enzimas, por exemplo outras proteases. Em uma forma de realização preferida, uma endopeptidase, por

exemplo um derivado de *Nocardopsis* sp. NRRL 18262, é combinado com uma exopeptidase, ou uma preparação de protease tendo atividade de exopeptidase, por exemplo uma preparação de protease derivado de *Aspergillus oryzae*, como divulgado em WO94/25580, tal como
5 Flavourzyme® (Novozymes NS, Dinamarca).

Em uma forma de realização particular, a endopeptidase para o uso de acordo com a invenção tem ótima atividade de pH próximo ao neutral, quando determinado pela hidrólise de caseína e reação subsequente de peptídeos solúveis em TCA com o-ftaldialdeído e 2-mercaptoetanol seguido
10 pela medição da absorbância do completo resultante a 340 nm.

O termo ótima atividade pH próximo ao neutro pode significar que a endopeptidase tem um ótimo pH no intervalo de pH 5.5 a 11, preferivelmente pH 7 a 11, mais preferivelmente pH 8 a 11, ainda mais preferivelmente pH 9.5 a 10.5 e mais preferivelmente em torno de pH 10.

15 Em uma outra forma de realização particular, a endopeptidase para o uso de acordo com a invenção é termoestável.

O termo termoestável pode significar que a temperatura a pH 9 é pelo menos 50 °C ou pelo menos 55 °C, preferivelmente pelo menos 60 °C, mais preferivelmente pelo menos 65 °C e ainda mais preferivelmente pelo
20 menos 67 °C, tal como cerca de 70 °C, quando determinado pela hidrólise de caseína como descrito acima.

Hidrolisado de caseína

Caseína no contexto da presente invenção é o grupo predominante de proteínas no leite, que pode contra por 75 a 80 % de todas as
25 proteínas no leite e queijo. A forma solúvel de caseína pode ser coagulado por ácidos e/ou por coalho.

Em uma forma de realização preferida, a caseína é de leite de vaca.

Caseína a ser usada no método da invenção pode, por

exemplo, ser na forma de caseinato de sódio, caseinato de potássio ou caseinato de cálcio.

No método da invenção, o material de caseína é tipicamente misturado ou dispersado em água para formar uma pasta que compreende
5 cerca de 1 % a cerca de 25 % 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 outra forma de realização, a pasta pode compreender cerca de 6 % a cerca de 10 % de proteína em peso. Em uma forma de realização adicional, a pasta pode compreender cerca de 11 % a cerca de 15 % de
10 proteína em peso. Ainda em outra forma de realização, a pasta pode compreender cerca de 16 % a cerca de 20 % de proteína em peso. Ainda em outra forma de realização, a pasta pode compreender cerca de 21 % a cerca de 25 % de proteína em peso. Em uma forma de realização preferida, a pasta pode compreender cerca de 5 % a cerca de 25 % de proteína em peso.

15 Após o material de proteína ser dispersado em água, o pH e/ou a temperatura de pasta de proteína pode ser ajustado deste modo como para otimizar a reação de hidrólise e em particular, para garantir que a endopeptidase usada nas funções de reação de hidrólise próximo a este ótimo nível de atividade. O pH da pasta de proteína pode ser ajustado e monitorado
20 de acordo com os métodos geralmente conhecidos na técnica. O pH da pasta de proteína pode ser ajustado de cerca de 5 a cerca de 10. Em uma forma de realização, o pH da pasta de proteína pode ser ajustado de cerca de 6 a cerca de 9. Em uma forma de realização preferida, o pH da pasta de proteína pode ser ajustado de cerca de 6,5 a cerca de 8. O pH da pasta de proteína pode ser
25 mantido em tal nível durante a reação de hidrólise ou pode ser deixado diminuir como a reação de hidrólise procede. A temperatura da pasta de proteína é preferivelmente ajustado e mantido de cerca de 45 °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 de cerca de 63 °C a cerca de 70 °C durante a reação de hidrólise. Em geral, as temperaturas acima desta faixa pode inativar endopeptidase, enquanto as temperaturas abaixo ou acima desta faixa tende-se a diminuir a atividade de endopeptidase.

5 A reação de hidrólise é geralmente iniciada pela adição de endopeptidase a uma pasta do material de proteína. Alternativamente, a enzima pode ser dispersada em água e o material de proteína adicionado levemente após agitação. O método posterior pode ser vantajoso quando a preparação de uma pasta de proteína concentrada para evitar que a
10 viscosidade tornar-se muito alto.

 Preferivelmente, a quantidade de endopeptidase usado no método de invenção é de cerca de 0,005 a cerca de 100 AU (como definido abaixo) por kg de caseína, preferivelmente de cerca de 0,01 a cerca de 50 AU por kg de caseína, mais preferivelmente de cerca de 0,02 a cerca de 30 AU
15 por kg de caseína.

 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 do período de reação) digere a hemoglobina em uma taxa inicial tal que esta é liberada por minuto em uma quantidade de produto solúvel TCA que dá a
20 mesma cor com reagente de fenol como um miliequivalente de tirosina. Quando a determinação da atividade AU, a concentração de hemoglobina pode preferivelmente ser em torno de 1,3 %.

 A quantidade de endopeptidase adicionada ao material de proteína pode e variará dependendo da fonte do material de proteína, o grau
25 desejado de hidrólise e a duração da reação de hidrólise. A quantidade de endopeptidase pode variar de cerca de 1 mg da proteína de enzima a cerca de 5000 mg da proteína de enzima por kg de caseína. Em uma forma de realização preferida, a quantidade pode variar de 1 mg da proteína de enzima a cerca de 1000 mg da proteína de enzima por kg de caseína. Em outra forma

de realização preferida, a quantidade pode variar de cerca de 5 mg de proteína de enzima a cerca de 500 mg de proteína de enzima de kg por caseína.

Como será apreciado pela pessoa habilitada, a duração da reação de hidrólise pode e variará. Geralmente falando, 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 resulta em um hidrolisado de caseína 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 2 % a cerca de 8 %.

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

15
$$DH = (\text{número de ligações de peptídeos clivadas} / \text{número total de ligações de peptídeos}) \times 100 \%$$

A pessoa habilitada conhecerá como para medir o DH. Este pode, por exemplo, ser feito usando um método como descrito em Adler-Nissen, J., 1986, *Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins*, Capítulo 5, pp. 122-20 124.

Após completar a etapa b), a endopeptidase pode ser inativada. Tal inativação pode ser realizada por qualquer método conhecido na técnica, por exemplo pelo aquecimento de pelo menos 75 °C, tal como pelo menos 80 °C ou pelo menos 85 °C.

25 Em uma forma de realização, o método da invenção ainda compreende o tratamento da composição de caseína com uma ou mais enzimas adicionais tendo atividade de protease. Tal enzima proteolítica adicional pode ser um ou mais endopeptidases e/ou um ou mais exopeptidases. Um ou mais exopeptidase pode ser, por exemplo, um ou mais

aminopeptidases e/ou um ou mais carboxipeptidase.

5 Incubação com a endopeptidase tendo pelo menos 50 % de identidade a SEQ ID N°: 1 e incubação com uma ou mais enzimas adicionais tendo a atividade de protease não pode ser simultaneamente realizado. Isto é, se as enzimas proteolíticas não realizam o mesmo pH e/ou a mesma temperatura, a composição de caseína pode ser incubada com uma (ou mais) enzimas proteolíticas como primeiro, seguido pelo ajuste opcional de pH e/ou temperatura e incubação subsequente com outras enzimas proteolíticas.

10 Quando usando uma ou mais enzimas adicionais tendo a atividade de protease, o hidrolisado de caseína resultante pode ter um grau mais alto de hidrólise (DH) do que indicado acima. Este pode, por exemplo, ter um grau de hidrólise de cerca de 5 a 25 %.

15 Um hidrolisado de caseína obtido pelo método da invenção pode ser usado em um produto alimentício, por exemplo em uma bebida. Um produto alimentício de acordo com a presente invenção pode ser qualquer produto pretendido para o consumo humano. Exemplos não limitantes de tais produtos alimentícios incluem barras de nutrição, bebidas misturadas secas, bebidas esportivas, bebidas energéticas e fórmula infantil. Um hidrolisado de caseína obtido pelo método da invenção também pode ser usado na nutrição
20 clínica, por exemplo em hospitais.

EXEMPLO 1

Comparação de hidrólise de caseinato de sódio com endopeptidase de *Nocardiosis* sp. NRRL 18262 tem a sequência mostrada na SEQ ID N°: 1 e Alcalase® 2.4L (Novozymes A/S, Dinamarca)

25 Hidrólise com protease:

Preparação de proteína:

Caseinato de sódio, Miprodan 30 de Aria Foods, Dinamarca, 88 % de proteína: 15 g + 285 g de água. O produto de caseinato foi recolocado em suspensão a uma suspensão de 5 % p/v com água

desmineralizada (Milli Q). A água foi aquecida a 60 °C e a proteína adicionada a água Milli Q enquanto a agitação em um misturador, 1 a 2 minutos ou até a proteína foi recolocada em suspensão/solubilizada.

Ajuste de pH:

5 O pH foi ajustado a 8.0 com 4 N de NaOH e foi mantido durante a reação de hidrólise.

Dosagem de enzima:

10 A protease Nocardiosis e Alcalase 2.4L foram dosados a 10, 50 e 100 mg de proteína de enzima (ep)/kg de proteína. A enzima foi armazenada em gelo durante o manuseio.

Tratamento de enzima:

Temperatura: 60 °C +/- 1 °C

Tempo: 120 minutos.

15 A enzima foi adicionada a suspensão de proteína em um agitador magnético em um banho de água. A enzima foi adicionada quando a temperatura na solução de proteína tem reagido a 60 °C.

Inativação de calor / armazenagem:

20 Imediatamente após o tratamento de enzima, as amostras foram aquecidas, tratadas em 15 minutos a 85 °C em um banho de água de agitação. As amostras foram esfriadas em gelo e refrigeradas a 4 °C durante a noite.

Após incubação a 4 °C durante a noite a solubilidade e grau de hidrólise foram avaliados.

Solubilidade:

25 A solubilidade foi medida a pH 4.0 e 6.5 usando um analisador de proteína/nitrogênio Leco FP 528 medindo um teor de proteína e nitrogênio por um método de combustão. O teor de nitrogênio foi medido na fração solúvel e solubilidade foi calculada como o teor de nitrogênio na porcentagem do teor de substância seca total.

Grau de hidrólise:

O grau de hidrólise da suspensão foi medido por pH stat como descrito em Adler-Nissen, J., 1986, Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins, Capítulo 5, pp. 122-124.

5

Resultados:Grau de hidrólise:

Concentração de protease (mg/kg de material caseinado)	Alcalase	Endopeptidase Nocardiope
0 (referência)	0,62	
10	2,87	2,42
50	7,17	5,61
100	10,92	7,30

Solubilidade pH 6.5:

Concentração de protease (mg/kg de material caseinado)	Solubilidade		Solubilidade/DH	
	Alcalase	Endopeptidase Nocardiope	Alcalase	Endopeptidase Nocardiope
0 (referência)	98,7		-	
10	76,5	92,1	26,7	38,1
50	79,0	90,3	11,0	16,1
100	86,9	95,2	8,0	13,0

Solubilidade pH 4.0:

Concentração de protease (mg/kg de material caseinado)	Solubilidade		Solubilidade/DH	
	Alcalase	Endopeptidase Nocardiope	Alcalase	Endopeptidase Nocardiope
0 (referência)	5,4		-	
10	29,3	42,0	10,2	17,4
50	73,3	70,4	10,2	12,6
100	84,5	73,9	7,7	10,1

Conclusão:

10

É visto que em uma dada concentração de protease, a endopeptidase de Nocardiopepsis dá um grau similar ou moderadamente baixo de hidrólise do que Alcalase. Entretanto, na solubilidade pH 6.5 foi visto ser geralmente mais alto com Nocardiopepsis endopeptidase do que com Alcalase ambos na dada concentração de protease e em um dado grau de hidrólise.

15

Também ao pH 4.0, a solubilidade / DH foi claramente mais alto para o hidrolisado obtido com a endopeptidase Nocardiopepsis do que para o hidrolisado obtido com Alcalase. No pH 6.5, a solubilidade do controle não hidrolisado foi mais alto do que dos produtos hidrolisados. Mas de um ponto funcional de vista, isto é com relação a capacidade de emulsificação e

alergenicidade, é frequentemente desejável ter uma certa hidrólise de proteína (aumento em DH). Considerando a partir de um ponto sensorial de vista, o DH não deve ser muito alto, como DH aumentado frequentemente resulta na severidade aumentada de hidrolisados de caseína.

5 Além disso, a inspeção visual revela uma suspensão uniforme quando o uso de endopeptidase Nocardiope como o catalisador enquanto Alcalase sob as dadas condições não foi uniforme (formação de massa uniforme).

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um hidrolisado de caseína, que compreende:

a) adicionar, à uma composição que compreende caseína,

5 b) incubar a fim de hidrolisar a caseína,

caracterizado pelo fato de que

a endopeptidase tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID

Nº: 1, e

o grau de hidrólise do hidrolisado de caseína é de 0,1 a 20%.

10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o pH ótimo da endopeptidase está entre pH 9,5 e pH 10,5.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a temperatura ótima da endopeptidase em pH 9 é pelo menos 60 °C.

15 4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase é de *Nocardiosis*.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase é adicionada em uma concentração de 10 a 100 mg de proteína de enzima por kg de caseína.

20 6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a endopeptidase é adicionada em uma atividade entre 0,02 e 30 AU por kg de caseína.

25 7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a composição compreende 5% a 25% de caseína.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o hidrolisado de caseína tem um grau de hidrólise de pelo menos 2%.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

8, caracterizado pelo fato de que ainda compreende o tratamento da composição de caseína com uma ou mais enzimas tendo atividade de protease.

5 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que ainda compreende tratamento da composição de caseína com uma ou mais exopeptidases.

11. Uso de um hidrolisado de caseína produzido pelo método como definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizado pelo fato de ser em um produto alimentício.

10