

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 964 808**

51 Int. Cl.:

A23J 3/34 (2006.01)

A23L 2/66 (2006.01)

A23L 33/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2020** **PCT/EP2020/065022**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2020** **WO20239998**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2020** **E 20733349 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023** **EP 3975733**

54 Título: **Hidrolizados de proteína de suero de la leche extensamente hidrolizados apetecibles**

30 Prioridad:

29.05.2019 EP 19177371
07.02.2020 EP 20156159

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2024

73 Titular/es:

ARLA FOODS AMBA (100.0%)
Sønderhøj 14
8260 Viby J, DK

72 Inventor/es:

SØRENSEN, HANS PETER;
BERTELSEN, HANS y
SØRENSEN, ANETTA KYNDE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 964 808 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

Hidrolizados de proteína de suero de la leche extensamente hidrolizados apetecibles

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos hidrolizados de proteína de suero de la leche que tienen un alto grado de hidrólisis, son apetecibles y tienen una baja turbidez sin someterse a ultrafiltración. La invención se refiere, asimismo, a métodos para preparar los nuevos hidrolizados de proteína de suero de la leche, a usos de los nuevos hidrolizados de proteína de suero de la leche y a una bebida carbonatada que comprende estos nuevos hidrolizados de proteína de suero de la leche.

Antecedentes de la invención

10 Es bien conocido el uso de hidrolizados de proteína de suero de la leche como ingredientes en diversos productos alimenticios. Los hidrolizados de proteína de suero de la leche se preparan habitualmente hidrolizando una sustancia proteica de suero de la leche, tal como un aislado de proteína de suero de la leche o concentrado de proteína de suero de la leche, con una preparación proteolítica y/o peptidolítica de calidad alimentaria hasta un grado deseado de hidrólisis. En algunas situaciones, se desea preparar un hidrolizado de proteína de suero de la leche con un alto grado
15 de hidrólisis, por ejemplo, un grado de hidrólisis del 15% o superior, por ejemplo, del 20% al 30%, para preparar hidrolizados de proteína de suero de la leche con una baja antigenicidad o hidrolizados que se absorban bien en el intestino. Sin embargo, los hidrolizados de proteína de suero de la leche existentes tienen el problema de que cuando la hidrólisis se hace demasiado extensa y se obtiene un alto grado de hidrólisis, el hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene un sabor amargo desagradable y, por lo tanto, no es adecuado para su uso en productos alimenticios o
20 bebidas en grandes cantidades.

En el documento WO 02/19 837 A1 se explica un proceso de preparación de un hidrolizado de proteína de suero de la leche a partir de un sustrato aislado de proteína de suero de la leche (PSL) que tiene mejor sabor, funcionalidad y propiedades inhibitorias de la ACE-I. En el documento WO 02/19 837 A1 se analizan los problemas de los sabores amargos en los hidrolizados de proteína de suero de la leche y se resuelve el problema de los sabores amargos
25 controlando la hidrólisis enzimática de manera que la hidrólisis termine cuando el grado de hidrólisis sea como máximo del 10%, tal como del 3% al 10%. En el documento WO 2016/156077 se hace referencia a hidrolizados de proteína a base de leche usando enzimas de origen microbiano o vegetal. En el documento RU 2 529 707 se explica un hidrolizado de proteína de suero de la leche con un alto grado de hidrólisis y un bajo grado de antigenicidad.

30 Por tanto, sería ventajoso un hidrolizado de proteína de suero de la leche que tenga un alto grado de hidrólisis (un grado de hidrólisis de al menos el 20%) y, por tanto, una baja antigenicidad y mejores propiedades de absorción, pero que al mismo tiempo no tenga un sabor amargo desagradable.

Sumario de la invención

35 Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que, usando combinaciones específicas de enzimas para la hidrólisis enzimática de la proteína de suero de la leche, los hidrolizados de proteína de suero de la leche se obtienen con un alto grado de hidrólisis, mientras que los hidrolizados de proteína de suero de la leche tienen un sabor aceptable y ningún sabor amargo o al menos una cantidad aceptable de compuestos amargos.

40 Así, un objeto de la presente invención se refiere a un método para preparar un hidrolizado de proteína de suero de la leche que tiene un grado de hidrólisis de al menos el 20% y en el que una solución de proteína del 4% p/p tiene una puntuación de amargor correspondiente a una solución del 0,08% p/v de cafeína o menos, sin que el hidrolizado de proteína de suero de la leche se someta a ningún tratamiento reductor del amargor.

El método de la presente invención se refiere a un método para preparar un hidrolizado de proteína de suero de la leche que tiene una turbidez baja y, por tanto, tiene un aspecto claro, sin ninguna etapa de ultrafiltración.

45 En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar un hidrolizado de proteína de suero de la leche que resuelva los problemas mencionados anteriormente de la técnica anterior con un sabor amargo desagradable cuando el grado de hidrólisis es alto.

Así, un aspecto de la invención se refiere a un método de preparación de un hidrolizado de proteína de suero de la leche que comprende:

- a) proporcionar una solución de proteína de suero de la leche que comprende proteína de suero de la leche en una cantidad de al menos el 50% en peso basada en el contenido de sólido total,
- 50 b) someter la solución de proteína de suero de la leche a hidrólisis enzimática, en donde la hidrólisis enzimática se realiza con el uso de una de las siguientes combinaciones de enzimas:
 - i. que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una proteasa similar a la tripsina

ii. que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*

iii. que comprende al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos bromelaína y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*

- 5 c) detener la hidrólisis enzimática mediante la inactivación de las enzimas cuando el grado de hidrólisis (GH) sea del 20% o superior para obtener un hidrolizado de proteína de suero de la leche;

en donde el método no comprende ninguna etapa de ultrafiltración del hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido en la etapa c).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un hidrolizado de proteína de suero de la leche que comprende:

- 10 – aminoácidos y péptidos libres, y
- que tiene un grado de hidrólisis de al menos el 20%, y
- péptidos que tienen un peso molecular de 2500 Da o más en una cantidad del 8% al 25% en peso o menos de la cantidad total de péptidos, y
- 15 – aminoácidos libres en una cantidad del 15% en peso o menos del contenido total de aminoácidos en el hidrolizado, y

en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche en una solución de proteína al 4% p/p tiene una puntuación de amargor correspondiente a una solución de cafeína del 0,08% p/v o menos.

Un aspecto adicional de la presente invención es proporcionar una bebida carbonatada que comprenda el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención.

- 20 Otro aspecto más no cubierto por la invención es proporcionar una bebida que comprenda el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención, en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche esté presente en la bebida en una cantidad correspondiente a un intervalo del 2% al 25% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada.

- 25 Otro aspecto más de la invención es el uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención como ingrediente alimentario.

Breve descripción de las figuras

- 30 La figura 1A muestra la turbidez nefelométrica (NTU) a diferentes concentraciones de proteína para la muestra 16 (un hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención hecho mediante hidrólisis enzimática de una PSL), la muestra 14 (hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención hecho mediante hidrólisis enzimática de un concentrado de proteína de suero de la leche (CPSL)) y la muestra 13 (un hidrolizado de proteína de suero de la leche de referencia que no se prepara usando una combinación de enzimas de la invención, pero el hidrolizado de proteína de suero de la leche se somete a ultrafiltración).

- 35 La figura 1B muestra la turbidez nefelométrica (NTU) a diferentes concentraciones de proteína para la muestra 16 (un hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención hecho mediante hidrólisis enzimática de una PSL). Se indican las desviaciones estándar.

La figura 1C muestra la turbidez nefelométrica (NTU) a diferentes concentraciones de proteína para la muestra 14 (un hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención hecho mediante hidrólisis enzimática de una PSL). Se indican las desviaciones estándar.

- 40 La figura 2 muestra muestras de diferentes concentraciones de proteínas de las muestras 13, 14 y 16. La concentración de proteína (p/p) es de izquierda a derecha: 8%, 6,4%, 4,8%, 3,2% y 1,8%. A) muestra la muestra 16, B) muestra la muestra 14 y C) muestra la muestra 13.

La figura 3 muestra la puntuación de amargor de diferentes concentraciones de cafeína y la puntuación de amargor de las muestras 13, 14 y 16.

- 45 La figura 4 muestra una representación en forma de telaraña del perfil de sabor y sensación en boca de las muestras 13, 15 y 16. El nivel de significancia de la diferencia entre los atributos con la puntuación más alta y más baja se indica con *** y es del 99,9% y con $P < 0,001$ (análisis ANNOVA).

La figura 5 muestra el porcentaje de los péptidos entre 7 y 19 aminoácidos en los intervalos de 7 a 10 aminoácidos y de 11 a 19 aminoácidos cuando se analizan mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés) o LC-MS/MS (MS).

La figura 6 muestra los péptidos que comprenden fenilalanina que se muestran como el porcentaje de todos los péptidos de la alfa-lactoalbúmina, la beta-lactoglobulina y la beta-caseína. Los péptidos más cortos analizados fueron 5 aminoácidos.

5 La figura 7 muestra el porcentaje numérico de péptidos de 5 a 19 aminoácidos de la alfa-lactoalbúmina, la beta-lactoglobulina y la beta-caseína.

La figura 8 muestra muestras de bebidas de izquierda a derecha: una bebida preparada sin tratamiento térmico, una bebida preparada con tratamiento UHT directo a 143 °C durante 6 segundos, una bebida preparada con tratamiento UHT indirecto durante 6 segundos y una bebida preparada con pasteurización a 90 °C durante 6,5 minutos.

10 La figura 9 muestra imágenes de geles de SDS-page usados para determinar la cantidad de BSA no degradada en diferentes muestras de hidrolizados de proteína de suero de la leche.

La figura 10 muestra la correlación entre la carbonatación y el pH de una bebida.

La figura 11 muestra el pH de diferentes muestras que comprenden proteínas de suero de la leche hidrolizadas y carbonatadas con 2,5 volúmenes de dióxido de carbono por volumen de la composición.

15 La figura 12 muestra el pH y la turbidez durante el calentamiento de una muestra que comprende una solución del 8% de proteína de la muestra 16 carbonatada con 2,5 volúmenes de CO₂ por volumen de solución.

La presente invención se describirá ahora con más detalle a continuación.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de analizar la presente invención con más detalle, primero se definirán los siguientes términos y convenciones:

20 Todas las referencias a características o limitaciones en singular de la presente invención incluirán la característica o limitación correspondiente en plural, y *viceversa*, a menos que el contexto en el que se haga la referencia especifique otra cosa o implique claramente lo contrario.

25 Todos los porcentajes a los que se hace referencia en el presente documento son porcentajes en peso a menos que se indique lo contrario. También, los términos "en peso de materia seca" y "en base a materia seca" se refieren al mismo concepto y se usan indistintamente.

El término "p/p", como por ejemplo el 1% p/p, se refiere a una composición que comprende el 1% en peso de un compuesto.

El término "apetecible" se refiere a tener un sabor lo suficientemente bueno para comer y/o beber, es decir, tener un sabor aceptable o satisfactorio para el consumidor humano.

30 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia.

Solución de proteína de suero de la leche

35 En el contexto de la presente invención, el término "solución" como "solución de proteína de suero de la leche" abarca composiciones que contienen una combinación de compuestos líquidos y sólidos o partículas semisólidas tales como, por ejemplo, partículas de proteína. Por lo tanto, una "solución" puede ser una suspensión o incluso una lechada. Sin embargo, la "solución de proteína de suero de la leche" es preferiblemente bombeable y la cantidad de líquido en la solución de proteína de suero de la leche es preferiblemente del 70% al 98%, más preferiblemente del 80% al 96%. El líquido usado para la solución de proteína de suero de la leche es típicamente agua.

40 La solución de proteína de suero de la leche típicamente comprenderá proteína en una cantidad del 2% en peso o más de la solución de proteína de suero de la leche. En una realización de la invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende proteína en el intervalo del 2% al 20% en peso de la solución de proteína de suero de la leche. Preferiblemente, la solución de proteína de suero de la leche comprende proteína en una cantidad en el intervalo del 5% al 15% en peso de la solución de proteína de suero de la leche.

45 La solución de proteína de suero de la leche usada en la hidrólisis se obtiene dispersando una composición que comprende proteína de suero de la leche en un líquido, tal como agua. Preferiblemente, la solución de proteína de suero de la leche se hace mezclando cualquiera de un concentrado de proteína de lactosuero, un concentrado de proteína de suero de la leche, un aislado de proteína de lactosuero y/o un aislado de proteína de suero de la leche con agua. Así, en una realización de la presente invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende un concentrado de proteína de lactosuero, un concentrado de proteína de suero de la leche, un aislado de proteína de lactosuero y/o un aislado de proteína de suero de la leche.

50

- La solución de proteína de suero de la leche de la presente invención comprende proteína de suero de la leche en una cantidad de al menos el 50% basada en el contenido de sólido total. Si el contenido de proteína de suero de la leche es menor que el 50% del contenido de sólido total, la composición molecular global (proporciones entre proteínas, hidratos de carbono, lípidos y minerales) será diferente, las enzimas pueden comportarse de manera diferente y, por tanto, el producto obtenido será diferente.
- Además de la proteína de suero de la leche, la solución de proteína de suero de la leche puede comprender otras proteínas en pequeñas cantidades, por ejemplo, caseína.
- La solución de proteína de suero de la leche típicamente comprende otros componentes además de la proteína. La solución de proteína de suero de la leche puede comprender otros componentes que se encuentran normalmente en el suero de la leche o lactosuero, tales como, por ejemplo, minerales, hidratos de carbono y/o lípidos. Alternativa o adicionalmente, la solución de proteína de suero de la leche puede comprender componentes que no sean naturales en el suero de la leche o lactosuero. Sin embargo, dichos componentes de la leche no naturales deben ser adecuados y seguros para su uso en la producción de alimentos.
- Cuanto menor sea el contenido de proteína, basado en el contenido de sólido total, en la solución de proteína de suero, mayores serán las cantidades de lípidos, hidratos de carbono (principalmente lactosa) y otras proteínas que la proteína de suero de la leche.
- La solución de proteína de suero de la leche puede comprender, por ejemplo, hidratos de carbono, tales como, por ejemplo, lactosa, oligosacáridos y/o productos de hidrólisis de lactosa (es decir, glucosa y galactosa). La solución de proteína de suero de la leche puede comprender, por ejemplo, hidratos de carbono en el intervalo del 0% al 10% en peso en función del contenido total de sólidos.
- Un aislado de proteína de suero de la leche (PSL) y un aislado de proteína de lactosuero (APL) comprenden cantidades muy bajas de hidratos de carbono, tales como lactosa. Por tanto, cuando se usa una PSL o un APL para la preparación de la solución de proteína de suero de la leche, el contenido de hidratos de carbono en la solución de proteína de suero de la leche está en el intervalo del 0% al 1% en peso basado en el contenido de sólido total. Si se usa un concentrado de proteína de suero de la leche (CPSL) o un concentrado de proteína de lactosuero (CPL) para preparar la solución de proteína de suero de la leche, la cantidad de hidratos de carbono en la solución de proteína de suero de la leche está preferiblemente en el intervalo del 2% al 8% en peso basado en el contenido de sólido total.
- La solución de proteína de suero de la leche también puede comprender lípidos, por ejemplo, en forma de triglicéridos y/u otros tipos de lípidos, tales como fosfolípidos.
- En el contexto de la presente invención, los términos "grasa" y "lípidos" tienen el mismo significado y se pueden usar indistintamente.
- La solución de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención comprende proteína de suero de la leche en una cantidad de al menos el 50% basada en el contenido de sólido total.
- Si el contenido de proteína en la solución de proteína de suero de la leche es menor que el 50% del contenido de sólido total, el hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido después de la hidrólisis puede no tener las características que definen el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención, es decir, sin sabor amargo desagradable en una solución de proteína al 4%, un grado de hidrólisis superior al 20%, aminoácidos libres en una cantidad del 15% en peso o menos y péptidos que tienen un peso molecular de 2500 Da o más en una cantidad del 8% al 25% en peso o menos de la cantidad total de péptidos.
- Una solución de proteína de suero de la leche con un contenido de proteína de suero de la leche menor que el 50% basado en el contenido total de sólidos comprenderá una gran cantidad de minerales, grasas e hidratos de carbono. No se desea hacer un hidrolizado de proteína de suero de la leche con un contenido de proteína de suero de la leche menor que el 50% en peso del contenido de sólido y altas cantidades de minerales, grasas e hidratos de carbono. Sin pretender imponer ninguna teoría, los autores de la presente invención creen que los minerales pueden afectar a la actividad de algunas enzimas. Esto también podría aplicarse a los lípidos e hidratos de carbono. Las altas cantidades de lípidos, minerales y hidratos de carbono también pueden afectar al sabor y la turbidez del hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido.
- Preferiblemente, la solución de proteína de suero de la leche comprende proteína de suero de la leche en una cantidad de al menos el 60% en peso basado en el contenido de sólido total, tal como al menos el 70% en peso basado en el contenido de sólido total, incluso más preferiblemente al menos el 80% en peso basado en el contenido de sólido total. En una realización más preferida de la presente invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende proteína de suero de la leche en una cantidad de al menos el 85% en peso basada en el contenido de sólido total, lo más preferido es que la solución de proteína de suero de la leche comprenda proteína de suero de la leche en una cantidad de al menos el 90% en peso basada en el contenido de sólido total.
- La proteína presente en la solución de proteína de suero de la leche debe ser principalmente proteínas de suero de la leche. Sin embargo, pueden estar presentes cantidades minoritarias de otras proteínas, tales como, por ejemplo,

- caseína. En una realización de la presente invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende, por lo tanto, proteína de suero de la leche en una cantidad del 90% en peso o más basada en la cantidad total de proteína. Preferiblemente, la solución de proteína de suero de la leche comprende proteína de suero de la leche en una cantidad del 95% en peso o más basada en la cantidad total de proteína. Por tanto, en otras realizaciones de la presente invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende como máximo un 10% en peso de caseína u otra proteína distinta del suero de la leche basada en la cantidad total de proteína, preferiblemente como máximo un 5% en peso, más preferiblemente como máximo un 3% en peso de caseína u otra proteína distinta del suero de la leche basada en la cantidad total de proteína.
- Si el contenido de grasa en la solución de proteína de suero de la leche es alto, influirá en la claridad y el sabor del hidrolizado de proteína obtenido. Por tanto, en una realización de la invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende lípidos en una cantidad de como máximo el 10% en peso basado en el contenido total de sólidos, tal como, como máximo el 8% en peso basado en el contenido de sólidos total, incluso más preferiblemente la solución de proteína de suero de la leche comprende lípidos en una cantidad de como máximo el 6% en peso basado en el contenido de sólido total.
- Si se usa un concentrado de proteína de suero de la leche para preparar la solución de proteína de suero de la leche, el contenido de lípidos/grasas es aproximadamente del 6% al 8% en peso del contenido de sólido total. Si, por el contrario, se usa un aislado de proteína de suero de la leche para la preparación de la solución de proteína de suero de la leche, la solución de proteína de suero de la leche está esencialmente exenta de grasa.
- En una realización preferida de la invención, la solución de proteína de suero de la leche está esencialmente exenta de grasa. La expresión "esencialmente exenta de grasa" significa que el contenido de lípidos en la solución de proteína de suero de la leche es menor que el 1% en peso con respecto al contenido total de sólidos, preferiblemente menor que el 0,5% en peso e incluso más preferiblemente menor que el 0,1% en peso basado en el contenido de sólido total.
- Si el contenido de grasa en la solución de proteína de suero de la leche es bajo, tal como un máximo del 0,5% basado en el contenido de sólido total, el hidrolizado de proteína de suero de la leche preparado de acuerdo con el método de la presente invención tendrá un aspecto claro. Preferiblemente, el contenido de lípidos en la solución de proteína de suero de la leche es menor que el 0,3% en peso del contenido de sólido total y, más preferiblemente, menor que el 0,2% de lípidos en peso basado en el contenido de sólido total.
- En una realización preferida de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche se obtiene usando una solución de proteína de suero de la leche de un aislado de proteína de suero de la leche y/o un aislado de proteína de lactosuero. Cuando se usa un aislado de proteína de suero de la leche y/o un aislado de proteína de lactosuero para la hidrólisis, el contenido de grasa será bajo (inferior al 0,5%). Esto hace posible preparar un hidrolizado de proteína de suero de la leche que, además de tener un alto grado de hidrólisis ($\text{GH} > 15\%$) y un buen sabor, también sea de aspecto claro en apariencia, sin ninguna etapa de ultrafiltración. Preferiblemente, la solución de proteína de suero de la leche es un aislado de proteína de suero de la leche o un aislado de proteína de lactosuero mezclado en agua.
- Proteína de suero de la leche**
- En un aspecto de la presente invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche se obtiene por hidrólisis de una solución que comprende proteína de suero de la leche.
- En el contexto de la presente invención, el término "proteína de suero de la leche" se refiere a la proteína que se encuentra en el suero de la leche o lactosuero. La proteína de suero de la leche de la solución de proteína de suero de la leche puede ser un subconjunto de especies de proteínas que se encuentran en el suero de la leche o lactosuero o puede ser el conjunto completo de especies proteicas que se encuentran en el suero de la leche y/o el lactosuero. La proteína de suero de la leche es una mezcla de proteínas globulares aisladas del suero de la leche, el material líquido creado como subproducto de la producción de queso. Las proteínas del suero de la leche son proteínas presentes en la fase sérica de la leche o de la leche coagulada. Las proteínas de la fase sérica de la leche, además de las proteínas del suero de la leche, también se denominan a veces proteínas del lactosuero.
- El término "lactosuero" se refiere al líquido que queda cuando la caseína y los glóbulos de grasa de la leche se han eliminado de la leche, por ejemplo, mediante microfiltración o ultrafiltración de poros grandes. El lactosuero también puede denominarse "suero ideal".
- El término "proteína de lactosuero" o "proteína de suero" se refiere a la proteína que está presente en el lactosuero.
- El término "suero de la leche" se refiere al sobrenadante líquido que queda después de precipitar y eliminar la caseína de la leche. La precipitación de caseína puede realizarse, por ejemplo, mediante la acidificación de la leche y/o mediante el uso de la enzima de cuajo.
- Existen varios tipos de suero de la leche, como el suero dulce, el suero ácido y el suero de caseína.
- La proteína de suero de la leche presente en la solución de proteína de suero de la leche de la presente invención puede derivarse de diferentes fuentes de suero de la leche, por ejemplo, suero de caseína, suero ácido o suero dulce.

En una realización preferida de la invención, las proteínas del suero de la leche en la solución de proteína de suero de la leche provienen del suero dulce. El suero dulce comprende principalmente las proteínas beta-lactoglobulina (BLG), alfa-lactalbúmina (ALA) y caseinomacropéptido (CMP). Sin embargo, el suero dulce puede comprender otras proteínas, tales como inmunoglobulinas, osteopontina, lactoferrina y proteínas de la membrana de los glóbulos grasos. El CMP no está presente en el suero de caseína ni en el suero ácido. En una realización de la invención, las proteínas del suero de la leche en la solución de proteína de suero de la leche provienen del suero dulce del que el CMP se ha eliminado total o parcialmente. Esto puede denominarse suero dulce modificado. La eliminación del CMP del suero dulce da como resultado un material proteico con un contenido de treonina y triptófano más cercano al de la leche materna.

En el contexto de la presente invención, el término "beta-lactoglobulina" también puede denominarse "BLG". Los términos se pueden usar indistintamente y se refieren a BLG de especies de mamíferos. Asimismo, el término "alfa-lactalbúmina" puede denominarse "ALA" en el contexto de la presente invención y se refiere a la alfa-lactalbúmina de especies de mamíferos.

El término "suero dulce", tal como se usa en el presente documento, se refiere al líquido que queda después de que la leche se haya cuajado y colado durante la elaboración de quesos tipo cuajo. El "suero dulce" se obtiene durante la producción de queso duro tipo cuajo, como el Cheddar o el queso suizo. El suero dulce se obtiene añadiendo enzimas de cuajo a una composición de leche, que divide la kappa-caseína en para-kappa-caseína y el péptido caseinomacropéptido (CMP), desestabilizando de se modo las micelas de caseína y provocando la precipitación de la caseína. El líquido que rodea a la caseína precipitada por el cuajo se denomina suero dulce. El valor de pH del suero dulce puede estar entre 5,2 y 6,7.

El suero dulce es un producto de la producción de queso que comprende aproximadamente del 10% al 15% en peso de proteína y aproximadamente del 75% al 80% de lactosa. Las proteínas del suero dulce son principalmente proteínas del suero de la leche, pero también pueden estar presentes pequeñas cantidades de caseína. Las proteínas del suero de la leche incluyen la beta-lactoglobulina (aproximadamente del 55% al 65%), la alfa-lactalbúmina (aproximadamente del 18% al 25%), la albúmina sérica bovina, las inmunoglobulinas, los caseinomacropéptidos (CMP), la osteopontina, la lactoferrina y las proteínas de la membrana de los glóbulos grasos de la leche.

El término "suero de caseína" (también denominado a veces suero agrio o suero ácido) se refiere al suero de la leche, que se obtiene de la producción de caseína/caseinato. En el contexto de la presente invención, suero de caseína no es lo mismo que suero ácido. El suero de caseína es la fracción de suero obtenida tras la separación de caseína/caseinatos mediante microfiltración. El suero de caseína no comprende CMP.

El término suero ácido se usa para el suero de la leche obtenido durante la producción de quesos de tipo ácido como el requesón y el quark. En la preparación de quesos de tipo ácido, la caseína se elimina de la leche mediante precipitación ácida, es decir, reduciendo el valor de pH de la leche a un pH inferior a 4,6, que es el punto isoelectrico de la caseína y que hace que las micelas de caseína se disgreguen y precipiten. El pH a menudo se reduce a un valor de 3,8 a 4,6. El líquido que rodea a la caseína precipitada con ácido a menudo se denomina suero ácido y no contiene CMP.

En una realización de la invención, la proteína de suero de la leche usada en la solución de proteína de suero de la leche no es suero ácido o suero de caseína.

La proteína de suero de la leche usada en la solución de proteína de suero de la leche en la presente invención puede ser un concentrado de proteína de suero de la leche (CPSL), un concentrado de proteína de lactosuero (CPL), un aislado de proteína de suero de la leche (PSL) o un aislado de proteína de lactosuero (APL). La diferencia entre un concentrado de proteína de suero de la leche y un aislado de proteína de suero de la leche es la composición del producto, particularmente el contenido de proteína. Los aislados de proteína de suero de la leche son más puros que los concentrados y otros componentes no proteicos se han eliminado parcialmente para "aislar" la proteína de suero de la leche. Así, un aislado de proteína de suero de la leche tiene un mayor porcentaje de proteína y puede ser lo suficientemente puro como para estar prácticamente exento de lactosa, exento de hidratos de carbono, exento de grasas y exento de colesterol.

En el presente contexto, los términos "concentrado de proteína de suero de la leche (CPSL)" y "concentrado de proteína de suero (CPL)" abarcan composiciones secas y líquidas de proteína de suero de la leche. El contenido de proteínas en un CPSL y un CPL usados en la presente invención no es menor que el 50% en peso basado en el contenido total de sólidos. Sin embargo, un concentrado de proteína de suero de la leche puede comprender cantidades mayores de proteína de suero de la leche, por ejemplo, un 80% en peso de proteína de suero de la leche basado en el contenido de materia seca. La porción seca del suero líquido de la leche se obtiene mediante la eliminación de suficientes constituyentes no proteicos del suero de la leche de manera que el producto seco no comprenda menos del 50% en peso de proteína de suero de la leche.

Un CPSL o CPL usado en la presente invención comprende típicamente:

(50-89)% en peso de proteína con respecto al contenido total de sólidos

(15-70)% en peso de BLG con respecto al contenido total de proteínas

(8-50)% en peso de ALA con respecto al contenido total de proteínas

(0-40)% en peso de CMP con respecto al contenido total de proteína

Como alternativa, aunque también se prefiere, es un CPSL o un CPL que comprenda:

5 (50-89)% en peso de proteína con respecto al contenido total de sólidos

(15-80)% en peso de BLG con respecto al contenido total de proteínas

(4-50)% en peso de ALA con respecto al contenido total de proteínas

(0-40)% en peso de CMP con respecto al contenido total de proteína

Preferiblemente, un CPSL o un CPL comprenden:

10 (50-89)% en peso de proteína con respecto al contenido total de sólidos

(15-80)% en peso de BLG con respecto al contenido total de proteínas

(4-50)% en peso de ALA con respecto al contenido total de proteínas

(0-40)% en peso de CMP con respecto al contenido total de proteínas

Más preferiblemente, un CPSL o un CPL comprende:

15 (70-89)% en peso de proteína con respecto al contenido total de sólidos

(30-80)% en peso de BLG con respecto al contenido total de proteínas

(4-35)% en peso de ALA con respecto al contenido total de proteínas

(0-25)% en peso de CMP con respecto al contenido total de proteínas

20 Los términos "aislado de proteína de suero de la leche" y "aislado de proteína de suero" se refieren a composiciones secas o líquidas, que generalmente se consideran casi exentas de lactosa y colesterol y tienen un contenido de proteína de suero de la leche de al menos el 90% en peso basado en el contenido de sólido total. Un aislado de proteína de suero de la leche puede comprender, por ejemplo, un 92% en peso de proteína de suero de la leche o más basándose en el contenido de sólido total. Preferiblemente, la PSL y el APL comprenden del 90% al 100% en peso de proteína basado en el contenido total de sólidos, tal como del 92% al 99% en peso de proteína basado en el contenido de sólido total.

Una PSL o un APL pueden comprender preferiblemente:

(90-100)% en peso de proteína con respecto al contenido total de sólidos

(15-70)% en peso de BLG con respecto al contenido total de proteínas

(8-50)% en peso de ALA con respecto al contenido total de proteínas

30 (0-40)% en peso de CMP con respecto al contenido total de proteínas

Como alternativa, aunque también se prefiere, una PSL o un APL pueden comprender:

(90-100)% en peso de proteína con respecto al contenido total de sólidos

(30-80)% en peso de BLG con respecto al contenido total de proteínas

(4-35)% en peso de ALA con respecto al contenido total de proteínas

35 (0-25)% en peso de CMP con respecto al contenido total de proteínas

Preferiblemente, una PSL puede comprender preferiblemente:

(90-100)% en peso de proteína con respecto al contenido total de sólidos

(60-70)% en peso de BLG con respecto al contenido total de proteínas

(10-20)% en peso de ALA con respecto al contenido total de proteínas

(10-20)% en peso de CMP con respecto al contenido total de proteínas

En una realización de la invención, la solución de proteína de suero de la leche usada en la preparación del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención comprende una cantidad total de proteína de suero de la leche en el intervalo del 50% al 98% en peso de materia seca, tal como del 70% al 97% en peso, preferiblemente del 72% al 95% en peso, incluso más preferiblemente en el intervalo del 75% al 95% en peso de materia seca.

Se puede usar cualquier fuente de proteína de suero de la leche adecuada para preparar la solución de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención. Las proteínas de suero de la leche usadas en la solución de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención son preferiblemente proteínas de suero de la leche de mamíferos, tal como, por ejemplo, leche de vaca, oveja, cabra, búfalo, camello, llama, yegua, caballo y/o ciervo. En algunas realizaciones preferidas de la invención, las proteínas de suero de la leche se derivan de leche bovina (de vaca).

Se prefiere que la solución de proteína de suero de la leche sea una solución de proteína de suero de la leche desmineralizada. Se prefiere que el contenido de minerales en la solución de proteína de suero de la leche sea bajo, ya que se prefieren bajas concentraciones de minerales tales como sodio, calcio, potasio, magnesio y fosfato en los hidrolizados de proteínas desde una perspectiva de nutrición y salud. Asimismo, los minerales, incluidos, por ejemplo, el sodio y el calcio, pueden interactuar con las proteínas del suero de la leche y afectar a la turbidez del producto, al comportamiento de agregación y a la tolerancia al calor de los hidrolizados de proteínas del suero de la leche. A altas concentraciones, algunos minerales, incluidos especialmente el sodio, el calcio y el zinc, pueden inhibir o promover la actividad proteolítica de algunas proteasas y, así, la presencia de una alta concentración de estos iones puede cambiar el patrón de escisión concertada de las proteasas. Así, en una realización de la invención, el contenido de minerales en la solución de proteína de suero de la leche es del 10% o menos basado en el contenido de sólido total, más preferiblemente del 8% o menos. En el contexto de la presente invención, el término "minerales" se refiere al contenido de cenizas. Los términos "mineral" y "ceniza" se pueden usar indistintamente y se refieren a lo mismo. Por tanto, con referencia al contenido de minerales de la solución de proteína de suero de la leche, debe entenderse como el contenido de cenizas de la solución de proteína de suero de la leche.

En una realización de la invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende un 30% en peso o más de BLG del contenido total de proteína, tal como un 40% en peso o más de BLG. Lo más preferiblemente, la solución de proteína de suero de la leche comprende un 50% en peso o más de BLG basado en el contenido total de proteína, incluso más preferiblemente la solución de proteína de suero de la leche comprende BLG en una cantidad del 55% en peso o más basado en el contenido de proteína total. En otra realización de la invención, la solución de proteína de suero de la leche comprende BLG en una cantidad en el intervalo del 30% al 95% en peso de BLG basado en el contenido total de proteína, tal como del 40% al 90% en peso de BLG basado en el contenido de proteína total, incluso más preferiblemente del 45% al 80% en peso basado en el contenido de proteína total.

En el contexto de la presente invención, el término "suero de la leche" se refiere a la composición líquida que queda cuando la caseína se ha eliminado de la leche. La caseína se puede eliminar, por ejemplo, mediante microfiltración, proporcionando un permeado líquido que está exento o esencialmente exento de caseína micelar, pero que contiene las proteínas del suero de la leche naturales. Este líquido permeado a veces se denomina suero de la leche, lactosuero o suero ideal.

La proteína de la solución de proteína de suero de la leche está preferiblemente lo más cerca posible de su estado natural y preferiblemente solo se ha sometido a un tratamiento térmico suave, si es que se ha sometido a alguno.

Hidrólisis enzimática

La etapa b) del método de acuerdo con la presente invención se refiere a someter la solución de proteína de suero de la leche a hidrólisis enzimática, en donde la hidrólisis enzimática se realiza con el uso de una de las siguientes combinaciones de enzimas:

- i. una combinación de enzimas que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una proteasa similar a la tripsina
- ii. una combinación de enzimas que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*
- iii. una combinación de enzimas que comprende al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* y al menos bromelaina.

Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que la hidrólisis enzimática de una solución de proteína de suero de la leche mediante la adición de cualquiera de las tres combinaciones de enzimas mencionadas dará como resultado hidrolizados de proteína de suero de la leche con un grado de hidrólisis superior al 20%, péptidos que tienen un peso molecular de 2500 Da o más en una cantidad del 8% al 25% en peso de la cantidad total de péptidos, un contenido de aminoácidos libres del 15% o menos, y donde el hidrolizado de proteínas de suero de la leche tiene un sabor aceptable y un bajo contenido de péptidos amargos. Los autores han descubierto que los

hidrolizados de proteína de suero de la leche se preparan mediante hidrólisis con las combinaciones de enzimas mencionadas i. a iii. no tienen sabor amargo en una solución de proteína al 4% p/p.

5 En la etapa c) de la presente invención, la hidrólisis enzimática se detiene inactivando las enzimas cuando el grado de hidrólisis (GH) es del 20% o más para obtener un hidrolizado de proteína de suero de la leche. El grado de hidrólisis (GH) se define como el porcentaje de enlaces peptídicos en las proteínas originales que se han escindido por hidrólisis.

En una realización de la invención, la serina endopeptidasa de *Aspergillus* es una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y/o *Aspergillus flavus*. La serina endopeptidasa de *Aspergillus* es preferiblemente una serina endopeptidasa similar a la subtilisina (EC 3.4.21).

10 En una realización de la invención, la combinación i) de enzimas comprende además una metaloendopeptidasa de *Bacillus*, tal como la bacilolisina. Por tanto, en una realización, la combinación i) de enzimas comprende:

- al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una metaloendopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de

Aspergillus y al menos una proteasa similar a la tripsina

15 En una realización más de la invención, la combinación ii) de enzimas puede comprender además una metaloendopeptidasa de *Bacillus*, tal como la bacilolisina. Por tanto, en una realización, la combinación ii) de enzimas comprende:

- al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una metaloendopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*

En una realización de la invención, la leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* es de *Aspergillus oryzae*.

20 En una realización, la serina endopeptidasa de *Bacillus* es subtilisina. La subtilisina es preferiblemente de *Bacillus licheniformis*.

En otra realización de la invención, la metaloendopeptidasa es bacilolisina. La bacilolisina es preferiblemente de *Bacillus*, y es más preferiblemente de *Bacillus amyloliquefaciens*. En una realización preferida de la invención, la bacilolisina no es de *Bacillus subtilis*.

25 En el contexto de la presente invención, la expresión "proteasa similar a la tripsina" es una proteasa de origen microbiano. Preferiblemente, la proteasa similar a la tripsina de origen microbiano es de *Fusarium sp*, en particular de *Fusarium oxysporum*. Por tanto, el término "proteasa similar a la tripsina", por ejemplo, no incluye la pancreatina que no sea de origen microbiano. Por el contrario, la pancreatina es una mezcla de enzimas derivadas del páncreas que, por ejemplo, comprende tripsina, quimiotripsina, amilasa y lipasa. Además, el término "proteasa similar a la tripsina"

30 no debe confundirse con "tripsina".

En otra realización más, la bromelaína es de *Ananas comosus*. La bromelaína es una endopeptidasa de cisteína.

En una realización de la invención, la hidrólisis enzimática en la etapa b) se realiza con el uso de una de las siguientes combinaciones de enzimas:

35 i) una combinación de enzimas que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una proteasa similar a la tripsina,

ii) una combinación de enzimas que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*,

40 iii) una combinación de enzimas que comprende al menos una combinación de una serina endopeptidasa y metaloendopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*,

iv) una combinación de enzimas que comprende al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos una bromelaína y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*.

En una realización preferida de la invención, la hidrólisis enzimática en la etapa b) se realiza con el uso de una de las siguientes combinaciones de enzimas:

45 i) una combinación de enzimas que comprende al menos una serina endopeptidasa de la especie *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una proteasa similar a la tripsina de origen microbiano,

ii) una combinación de enzimas que comprende al menos subtilisina de una especie de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*,

iii) una combinación de enzimas que comprende al menos una combinación de bacilolisina y subtilisina de una especie de *Bacillus*, al menos una serina endoproteasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*,

5 iv) una combinación de enzimas que comprende al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos bromelaína de *Ananas comosus*, y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*.

En realizaciones preferidas de la invención, las combinaciones de enzimas son:

i) combinación de enzimas que comprende al menos una enzima del grupo de EC 3.4.21.62, al menos una enzima adicional del grupo EC 3.4.21 y al menos una enzima adicional del grupo de EC 3.4.21.4,

10 ii) una combinación de enzimas que comprende al menos una enzima del grupo de EC 3.4.21.62, al menos una enzima adicional del grupo EC 3.4.21 y al menos una enzima adicional del grupo de EC 3.4.11,

iii) una combinación de enzimas que comprende al menos una enzima del grupo de EC 3.4.21.62, una enzima adicional del grupo de EC 3.4.24.28, al menos una enzima adicional del grupo EC 3.4.21 y al menos una enzima adicional del grupo de EC 3.4.11,

15 iv) una combinación de enzimas que comprende al menos una enzima del grupo de EC 3.4.24.28, al menos una enzima adicional del grupo EC 3.4.22.32 y al menos una enzima adicional del grupo de EC 3.4.11.

En otras realizaciones preferidas de la invención, las combinaciones de enzimas son:

i) que comprenden al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus licheniformis*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*, opcionalmente también bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*,

20 ii) que comprenden al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus licheniformis*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*,

iii) que comprenden al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus licheniformis*, una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*,

25 iv) que comprenden al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos bromelaína de *Ananas comosus*, y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*.

La serina endopeptidasa de *Bacillus licheniformis* es preferiblemente subtilisina.

En otras realizaciones preferidas de la invención, las combinaciones de enzimas son:

30 i) que comprenden al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus* (EC 3.4.21.62), al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* (EC 3.4.21), y al menos una proteasa similar a la tripsina (EC 3.4.21.4),

ii) que comprenden al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus* (EC 3.4.21.62), al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* (EC 3.4.21) y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* (EC 3.4.11),

35 iii) que comprenden al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus* (EC 3.4.21.62), una bacilolisina (EC 3.4.24.28), al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* (EC 3.4.21.63) y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* (EC 3.4.11),

iv) que comprenden al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (EC 3.4.24.28), al menos bromelaína (EC 3.4.22.32), y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* (EC 3.4.11).

Las combinaciones i) a iv) de enzimas usadas en el presente método de preparación de un hidrolizado de proteína de suero de la leche pueden comprender otras enzimas distintas de las enzimas principales mencionadas. Por el término "enzimas primarias" se entiende las enzimas que son más abundantes en las preparaciones. En la siguiente lista, los números de acceso de Uniprot se proporcionan entre paréntesis para identificar las proteasas anotadas con un nombre específico.

45 Por ejemplo, las combinaciones de enzimas pueden comprender una o más enzimas con alta identidad de secuencia (95-100%) con enzimas seleccionadas del grupo que consiste en la peptidohidrolasa (A0A364MDR7), la proteína de la familia de las subtilasas (I8A6W5), la fungalisina metalopeptidasa M36 (A0A2P2H013), la proteasa neutra 2 (A0A364MH70), asperlogilopepsina-1 (B8NLY9), leucilaminopeptidasa A (Q2U1F3), leucilaminopeptidasa 2 (Q2ULM2), dipeptilpeptidasa 4 (Q2UH35), dipeptidilpeptidasa 5 (Q9Y8E3), proteasa neutra 1 (Q2U1G7), proteasa neutra 2 (P46076), proteasa alcalina Caso 1 (P12547) y proteína de la familia de las proliloligopeptidasas (B8NBM3).

50 En un aspecto de la invención, las enzimas principales de la combinación i) de enzimas son la serina endopeptidasa de *Bacillus*, una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y una proteasa similar a la tripsina. La serina endopeptidasa de

Bacillus es preferiblemente subtilisina, y la serina endopeptidasa de *Aspergillus* es preferiblemente una proteína de la familia de las subtilasas. En una realización de la invención, la combinación i) de enzimas puede comprender además una o más de aminopeptidasa (tal como la peptidohidrolasa y la leucilaminopeptidasa), metaloendopeptidasa (tal como la bacilolisina y la fungalisina metalopeptidasa, proteasa neutra), proteína de la familia de las proliloligopeptidasas y aspergiloepsina-1 (endopeptidasa aspártica). Se espera que al menos el 80% de las enzimas presentes en la combinación de enzimas i) sean serina endopeptidasa de *Bacillus*, serina endopeptidasa de *Aspergillus* y proteasa similar a la tripsina. Un ejemplo de una preparación que comprende una serina endopeptidasa de *Bacillus* es Protamex (Novozymes A/S). Protamex también comprende bacilolisina. Ejemplos de preparaciones que comprenden una serina endopeptidasa de *Aspergillus* son Promod 782 (Biocatalysts Ltd) y Protease A Amano 2 SD (Amano Enzyme Ltd), donde la enzima principal es una serina endopeptidasa de *Aspergillus ozyzae*. El Promod 782 y la Proteasa A Amano 2 SD también comprenden las enzimas peptidohidrolasa, leucilaminopeptidasa, fungalisina metalopeptidasa M36, proteína de la familia de las proliloligopeptidasas, proteasa neutra 2 y aspergiloepsina-1 y las enzimas principales son las endopeptidasas de serina. La proteasa similar a la tripsina puede proporcionarse, por ejemplo, en Formea TL 1200 BG (Novozymes A/S).

En un aspecto de la invención, la combinación ii) de enzimas comprende serina endopeptidasa de *Bacillus*, serina endopeptidasa de *Aspergillus* y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* como enzimas principales. La serina endopeptidasa de *Bacillus* es preferiblemente subtilisina, y la serina endopeptidasa de *Aspergillus* es preferiblemente una proteína de la familia de las subtilasas y proteasa alcalina. Las leucilaminopeptidasas de *Aspergillus* pueden ser, por ejemplo, una o más de peptidohidrolasa, leucilaminopeptidasa A y leucilaminopeptidasa 2. En una realización de la invención, la combinación ii) de enzimas puede comprender además una o más de las metaloendopeptidasas: la fungalisina metalopeptidasa M36, la proteasa neutra 1 y la proteasa neutra 2. La combinación ii) de enzimas también puede comprender aspergiloepsina-1 (endopeptidasa aspártica), dipeptilpeptidasa 4 y dipeptidilpeptidasa 5. Se espera que al menos el 80% de las enzimas presentes en la combinación ii) de enzimas sean serina endopeptidasa de *Bacillus*, serina endopeptidasa de *Aspergillus* y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*. Un ejemplo de una preparación que comprende una serina endopeptidasa de *Bacillus* es la alcalasa (Novozymes A/S), que comprende subtilisina. Ejemplos de preparaciones que comprenden una serina endopeptidasa de *Aspergillus* son Promod 782 y Protease A Amano 2 SD, donde la enzima principal es una serina endopeptidasa de *Aspergillus ozyzae*. El Promod 782 y la Proteasa A Amano 2 SD también comprenden las enzimas peptidohidrolasa, leucilaminopeptidasa, fungalisina metalopeptidasa M36, proteína de la familia de las proliloligopeptidasas, proteasa neutra 2 y aspergiloepsina-1 y las enzimas principales son las endopeptidasas de serina. Un ejemplo de una preparación que comprende la leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* es Flavourzyme Conc BG (Novozymes A/S), donde la enzima principal es una leucilaminopeptidasa. Flavourzyme Conc BG también comprende leucilaminopeptidasa A, leucilaminopeptidasa 2, dipeptilpeptidasa 4, dipeptidilpeptidasa 5, proteasa neutra 1, proteasa neutra 2, proteasa alcalina 1 y la enzima principal son las leucilaminopeptidasas.

En un aspecto de la invención, la combinación iii) de enzimas comprende serina endopeptidasa de *Bacillus*, serina endopeptidasa de *Aspergillus*, serinaendopeptidasa de *Aspergillus* y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* como enzimas principales. La serina endopeptidasa de *Bacillus* es preferiblemente subtilisina, la metaloendopeptidasa de *Bacillus* es preferiblemente bacilolisina y la serina endopeptidasa de *Aspergillus* es preferiblemente proteína de la familia de las subtilasas y proteasa alcalina. Las leucilaminopeptidasas de *Aspergillus* pueden ser, por ejemplo, una o más de peptidohidrolasa, leucilaminopeptidasa A y leucilaminopeptidasa 2. En una realización de la invención, la combinación iii) de enzimas puede comprender además una o más de las metaloendopeptidasas: la fungalisina metalopeptidasa M36, la proteasa neutra 1 y la proteasa neutra 2. La combinación ii) de enzimas también puede comprender aspergiloepsina-1 (endopeptidasa aspártica), dipeptilpeptidasa 4 y dipeptidilpeptidasa 5. Al menos el 80% de las enzimas presentes en la combinación iii) de enzimas son serina endopeptidasa de *Bacillus*, bacilolisina, serina endopeptidasa de *Aspergillus* y una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*. Ejemplos de preparados que comprenden tanto la serina endopeptidasa de *Bacillus* (subtilisina) como la bacilolisina son Promod 950L (Biocatalysts Ltd) y Protamex. Los ejemplos de preparaciones que comprenden una serina endopeptidasa de *Aspergillus* son la proteasa A Amano 2 SD y el Promod 782. El Promod 782 y la Proteasa A Amano 2 SD también comprenden las enzimas peptidohidrolasa, leucilaminopeptidasa, fungalisina metalopeptidasa M36, proteína de la familia de las proliloligopeptidasas, proteasa neutra 2 y aspergiloepsina-1, y las enzimas principales son las endopeptidasas de serina. Un ejemplo de una preparación que comprende la leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* es Flavourzyme Conc BG, donde la enzima principal es una leucilaminopeptidasa. Flavourzyme Conc BG también comprende las enzimas leucilaminopeptidasa A, leucilaminopeptidasa 2, dipeptilpeptidasa 4, dipeptidilpeptidasa 5, proteasa neutra 1, proteasa neutra 2, y proteasa alcalina 1 y la enzima principal son las leucilaminopeptidasas.

En un aspecto de la invención, la combinación iv) de enzimas comprende bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, bromelaína y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* como enzimas principales. Las leucilaminopeptidasas de *Aspergillus* pueden ser, por ejemplo, una o más de las peptidohidrolasa, leucilaminopeptidasa A y leucilaminopeptidasa 2. En una realización de la invención, la combinación iv) de enzimas puede comprender además una o más de las metaloendopeptidasas: la fungalisina metalopeptidasa M36, la proteasa neutra 1 y la proteasa neutra 2. La combinación ii) de enzimas también puede comprender la dipeptil peptidasa 4, la dipeptidil peptidasa 5 y la proteasa alcalina (serina proteasa de *Aspergillus*). Se espera que al menos el 80% de las enzimas presentes en la combinación iv) de enzimas sean bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, bromelaína y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*. Un ejemplo de una preparación que comprende la bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens* es la Neutrasa. Un ejemplo

de bromelaína es Promod 523 MDP, mientras que un ejemplo de leucilaminopeptidasa de *Aspergillus* es Flavourzyme conc BG.

El método de preparación de hidrolizados de proteína de suero de la leche de la presente invención no debe limitarse a la cantidad de enzimas añadidas en la etapa de hidrólisis, ya que la cantidad de enzima añadida depende del tipo de enzima y de la actividad de la enzima. Sin embargo, como guía, la hidrólisis enzimática se realiza con una combinación de enzimas, donde la cantidad total de enzimas está en el intervalo de 0,05 g a 10 g por 100 g de proteína, tal como de 0,1 g a 7,5 g de enzima por 100 g de proteína. Preferiblemente, la cantidad de enzima es de 0,2 g a 5,0 g por 100 g de proteína.

La proporción entre las tres enzimas diferentes en las combinaciones i. a iii. puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1-10:1-10: 1-10, por ejemplo, en el intervalo de 1-8:1-8:1-8. Sin embargo, la presente invención no debe limitarse a la cantidad de enzima añadida, ya que esto dependerá de la actividad de las enzimas usadas.

La hidrólisis enzimática realizada en la etapa b) de la presente invención se realiza preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 40 °C a 75 °C, tal como de 40 °C a 70 °C. La hidrólisis enzimática debe realizarse a una temperatura en la que las enzimas tengan una actividad óptima. En una realización preferida, la hidrólisis enzimática se realiza a una temperatura en el intervalo de 45 °C a 65 °C.

El período de tiempo para la hidrólisis enzimática antes de que se detenga la hidrólisis en la etapa c) depende de la cantidad y la actividad de las enzimas usadas. La hidrólisis continúa hasta que el grado de hidrólisis sea del 20% o más. La hidrólisis enzimática en la etapa b) se realiza preferiblemente en un período de tiempo en el intervalo de 3 horas a 20 horas, tal como de 3,5 horas a 15 horas, preferiblemente de 4 horas a 10 horas e incluso más preferiblemente de 4 horas a 7 horas.

La solución de proteína de suero de la leche debería tener preferiblemente un pH en el intervalo de 6 a 9 durante la hidrólisis enzimática. En una realización preferida, el pH durante la hidrólisis enzimática en la etapa b) es de 6,5 a 8,0.

En este intervalo de pH, las enzimas tienen la mayor actividad y, por lo tanto, escinden las proteínas en péptidos y aminoácidos libres de manera más eficiente. Es más, en este intervalo de pH se evita la agregación, tanto durante el proceso de hidrólisis como también durante el tratamiento térmico para inactivar las enzimas.

En la etapa c) del método de preparación de un hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención, la hidrólisis enzimática se detiene inactivando las enzimas. En el contexto de la presente invención, el término "inactivación" se refiere a la inactivación irreversible de la enzima. La inactivación de las enzimas debe ser irreversible, de modo que las enzimas no se activen en otras condiciones.

La hidrólisis se detiene cuando el grado de hidrólisis es al menos del 20%. En una realización de la invención, la hidrólisis se detiene en la etapa c) cuando el grado de hidrólisis está en el intervalo del 20% al 35%, preferiblemente del 20% al 30%, e incluso más preferiblemente del 20% al 28%.

La inactivación de las enzimas en la etapa c) y, por tanto, la detención de la hidrólisis puede realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la inactivación de las enzimas mediante la modificación de la temperatura a una temperatura en la que las enzimas estén inactivas y desnaturalizadas. La inactivación y desnaturalización de las enzimas también podrían realizarse modificando el pH de la solución a un pH en el que las enzimas estén inactivas.

Por tanto, en una realización de la invención, la inactivación de las enzimas en la etapa c) se realiza calentando la solución de proteína de suero de la leche con enzimas añadidas a una temperatura de al menos 80 °C. La inactivación de las enzimas es preferiblemente mediante calentamiento a una temperatura de 80 °C a 130 °C, tal como de 85 °C a 125 °C, incluso más preferiblemente de 90 °C a 120 °C. La inactivación de las enzimas en la etapa c) mediante calentamiento puede ser, por ejemplo, mediante calentamiento a una temperatura alta durante un período de tiempo corto, tal como mediante calentamiento a una temperatura de 110 °C a 130 °C durante 10 a 30 segundos. Alternativamente, la inactivación de las enzimas en la etapa c) puede ser mediante calentamiento a una temperatura relativamente baja, pero durante un período de tiempo más largo. Esto podría implicar calentar de 80 °C a 90 °C durante 5 a 10 minutos.

En otra realización de la presente invención, la inactivación irreversible de las enzimas en la etapa c) comprende aumentar o disminuir el pH de la solución de proteína de suero de la leche con enzimas añadidas, es decir, el hidrolizado de proteína de suero de la leche, hasta un pH en el que las enzimas están inactivas. En una realización de la invención, el pH se incrementa a un pH de 10 o superior. En otra realización, el pH se reduce a un pH de 4 o inferior.

El método no comprende ninguna etapa de ultrafiltración del hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido en la etapa c). Fue sorprendente para los autores de la presente invención que la hidrólisis enzimática de una solución de proteína de suero de la leche con una cantidad baja de lípidos, es decir, una PSL o un APL, con las combinaciones de enzimas especificadas diera como resultado hidrolizados de proteína de suero de la leche con un sabor apetecible y que también tuvieran un aspecto claro sin necesidad de ninguna etapa de ultrafiltración implicada.

Los hidrolizados de proteína de suero de la leche conocidos en la técnica se pueden dividir en hidrolizados ultrafiltrados y no ultrafiltrados. Los hidrolizados de proteínas no ultrafiltradas conocidos tendrán un aspecto turbio o poco claro, donde los hidrolizados de proteínas ultrafiltrados son generalmente de aspecto claro.

5 En el contexto de la presente invención, el término "ultrafiltración" se refiere a la filtración por membrana con una membrana que tiene un límite en el intervalo de 1500 Da a 50 000 Da, preferiblemente de 2000 Da a 20 000 Da.

Durante la ultrafiltración de los hidrolizados de proteínas, la grasa, la proteína intacta y algunos de los péptidos más grandes son retenidos por la membrana de ultrafiltración y retenidos en el material retenido, mientras que los aminoácidos libres, los péptidos más pequeños y los minerales están en el permeado de ultrafiltración.

10 En una realización de la presente invención, la solución de proteína de suero de la leche se prepara como una solución de PSL y APL con un bajo contenido de lípidos. Fue sorprendente para los autores de la presente invención que la preparación de un hidrolizado de proteína de suero de la leche con las combinaciones de enzimas de la presente invención diera como resultado hidrolizados de proteína de suero de la leche que tenían un alto grado de hidrólisis, un buen sabor con bajo amargor y un aspecto claro.

15 Sin embargo, el bajo contenido de lípidos no es la única explicación de por qué fue posible para los autores de la presente invención preparar hidrolizados de proteínas claros. Sorprendentemente, los autores de la presente invención han descubierto que cuando una solución de proteína de suero de la leche con un bajo contenido de lípidos se sometía a hidrólisis enzimática con cualquiera de las combinaciones de enzimas mencionadas, era posible preparar un hidrolizado de proteína de suero de la leche con un grado de hidrólisis superior al 20%, que no tenía sabor amargo en una solución de proteína al 4% y que tenía un aspecto claro. Para que su aspecto fuera claro, era necesario usar una
20 solución de proteína de suero de la leche con un bajo contenido de lípidos. Sin embargo, el bajo contenido de lípidos no fue la única razón por la que se obtuvieron hidrolizados claros. Sorprendentemente, los autores de la presente invención descubrieron que la hidrólisis con las combinaciones enzimáticas específicas conduce a hidrolizados claros. En pruebas comparativas, se observó que otros hidrolizados de proteína de suero de la leche con un bajo contenido de lípidos, pero en los que la hidrólisis se hizo con otras enzimas distintas de las usadas en el método de la presente
25 invención, no dieron como resultado hidrolizados de proteína de suero de la leche con un aspecto claro y poco amargor. El hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido mediante el método de la presente invención puede concentrarse y/o secarse preferiblemente. Por tanto, en una realización de la invención, el método comprende una etapa d) de concentrar y/o secar el hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido en la etapa c). La concentración puede ser, por ejemplo, mediante una o más de las operaciones unitarias de nanofiltración, filtración
30 por ósmosis inversa y evaporación.

En otra realización de la invención, también puede usarse la etapa de secado implica una o más de las operaciones unitarias: el secado por pulverización, la liofilización y el secado por centrifugación instantánea, el secado rotatorio y/o el secado en lecho fluido.

Hidrolizado de proteína de suero de la leche

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a un hidrolizado de proteína de suero de la leche que comprende:

- aminoácidos y péptidos libres, y
- con un grado de hidrólisis de al menos el 20%, y
- péptidos que tienen un peso molecular de 2500 Da o más en una cantidad del 8% al 25% en peso o menos de la cantidad total de péptidos, y
- 40 – aminoácidos libres en una cantidad del 15% en peso o menos del contenido total de aminoácidos en el hidrolizado, y

en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche en una solución de proteína al 4% tiene una puntuación de amargor correspondiente a la de una solución de cafeína del 0,08% p/v o menos.

45 En un aspecto de la invención, el grado de hidrólisis del hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención es de al menos el 20%. Un objeto de la presente invención era hacer un hidrolizado de proteína de suero de la leche con un alto grado de hidrólisis, que sin ninguna etapa de ultrafiltración no tuviera un sabor amargo desagradable. Es bien sabido que los péptidos son responsables del sabor amargo en muchos hidrolizados. En general, se espera que la hidrólisis extensa que proporciona hidrolizados con un alto grado de hidrólisis dé como resultado hidrolizados con un sabor amargo. Para reducir el sabor amargo de los hidrolizados de proteínas extensamente hidrolizados, los
50 hidrolizados se pueden tratar con carbón activado que se puede eliminar de nuevo junto con los péptidos de sabor amargo. Pueden desearse proteínas extensamente hidrolizadas porque los péptidos tienen otras funcionalidades distintas de la proteína intacta. Por ejemplo, los péptidos pueden resistir los tratamientos térmicos mejor que la proteína de suero intacta.

Sin embargo, los autores de la presente invención han encontrado sorprendentemente un método para preparar un

hidrolizado de proteína de suero de la leche que tiene un alto grado de hidrólisis que no tiene un sabor amargo desagradable, aunque el hidrolizado de proteína de suero de la leche no se sometió a ningún tratamiento adicional para eliminar los péptidos de sabor amargo.

5 En una realización preferida de la invención, el grado de hidrólisis del hidrolizado de proteína de suero de la leche es de al menos el 20%.

En otra realización de la presente invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención tiene un grado de hidrólisis del 20% al 35%, tal como del 20% al 30%, preferiblemente del 20% al 28% e incluso más preferiblemente del 20% al 25%.

10 El hidrolizado de proteína de suero de la leche puede comprender aminoácidos libres y, si están presentes aminoácidos libres, están presentes en una cantidad del 15% en peso o menos del contenido total de aminoácidos en el hidrolizado. Preferiblemente, el contenido de aminoácidos libres es del 12% en peso o menos del contenido total de aminoácidos. Por "contenido total de aminoácidos", en el contexto de la presente invención, se entiende la cantidad total de aminoácidos presentes, incluidos los aminoácidos libres y los aminoácidos unidos a péptidos y proteínas.

15 El contenido de aminoácidos libres en el hidrolizado de proteína de suero de la leche no es superior al 15% en peso del contenido total de aminoácidos, tal como no superior al 13% en peso del contenido total de aminoácidos, preferiblemente no superior al 10% en peso del contenido total de aminoácidos, incluso más preferiblemente, el contenido de aminoácidos libres no es superior al 8% del contenido total de aminoácidos.

20 En otras realizaciones de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende aminoácidos libres en una cantidad del 2% al 15% en peso del contenido total de aminoácidos en el hidrolizado, preferiblemente aminoácidos libres en una cantidad del 4% al 13% en peso del contenido total de aminoácidos en el hidrolizado.

Los autores de la presente invención han descubierto que los péptidos del hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención comprenden péptidos que tienen un peso molecular de 2500 Da o más en una cantidad en el intervalo del 8% al 25% en peso, incluso más preferentemente del 10% al 20% en peso.

25 En una realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención comprende péptidos que tienen un peso molecular de 375 Da o menos en una cantidad de al menos el 10% en peso. Los péptidos que tienen un peso molecular de 375 Da o menos pueden estar presentes, por ejemplo, en el hidrolizado de proteína de suero de la leche en una cantidad en el intervalo del 10% al 25% en peso.

30 Los autores de la presente invención han descubierto que los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención tienen un sabor amargo reducido en comparación con los hidrolizados de proteína de suero de la leche conocidos que tienen un alto grado de hidrólisis, también si se han sometido a filtración por membrana con una membrana de ultrafiltración y/o se han sometido a tratamiento con carbón activado.

El amargor de los hidrolizados de proteína de suero de la leche se ha comparado con el amargor de la cafeína, y los hidrolizados de proteína de suero de la leche en una solución de proteína al 4% p/p tienen un sabor menos amargo que el sabor de una solución de cafeína al 0,08% p/v.

35 Por tanto, la puntuación de amargor de los hidrolizados de proteína de suero de la leche en una solución de proteína al 4% p/p corresponde a la puntuación de amargor del 0,08% p/v de cafeína o menos. Preferiblemente, la puntuación de amargor de los hidrolizados de proteína de suero de la leche en una solución proteica al 4% p/p de la invención corresponde a la puntuación de amargor del 0,07% p/v de cafeína o inferior, incluso más preferiblemente a una puntuación de amargor del 0,065% de cafeína o inferior. Lo más preferiblemente, la puntuación de amargor de los
40 hidrolizados de proteína de suero de la leche en una solución de proteína al 4% p/p de la invención corresponde a la puntuación de amargor del 0,060% p/v.

45 En una realización adicional de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene una turbidez nefelométrica (NTU) de 100 o menos en una solución de proteína al 4% p/p. Otra forma de realización de la invención consiste en obtener un hidrolizado de proteína de suero de la leche que, además de tener un alto grado de hidrólisis y un sabor aceptable, también tenga un aspecto claro. Se desea un hidrolizado de proteína de suero de la leche claro y de buen sabor, ya que se puede usar, por ejemplo, en bebidas, geles y batidos y proporciona un mayor atractivo para el consumidor.

50 Si la turbidez nefelométrica medida es inferior a 100 NTU en una solución de proteína al 4% p/p, la muestra se percibe como transparente. Si la turbidez nefelométrica es superior a 100 NTU en una solución de proteína al 4%, el hidrolizado de proteína de suero de la leche medido se percibe como no transparente. Si la turbidez nefelométrica está por debajo de 40 NTU, la solución se percibe como clara. Sin embargo, un hidrolizado de proteína de suero de la leche que tenga una turbidez entre 40 NTU y 100 NTU puede ser transparente (pero poco claro o turbio). En el contexto de la presente invención, el término "transparente" se refiere a una solución que deja pasar algo de luz para que se puedan ver los
55 objetos detrás de la solución, es decir, es posible ver a través de la solución. El término "claro" se refiere a una solución que es incolora y, por lo tanto, es posible ver a través de la solución sin que nada limite ver a su través. Por tanto, una solución puede ser transparente, pero no clara.

- En una realización adicional de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene una turbidez nefelométrica (NTU) del 80% o inferior en una solución de proteína al 4% p/p, tal como una turbidez nefelométrica (NTU) del 60% o inferior en una solución de proteína al 4% p/p, preferiblemente una turbidez nefelométrica (NTU) del 50% o inferior en una solución de proteína al 4% p/p, incluso más preferiblemente una turbidez nefelométrica (NTU) del 40% o inferior en una solución de proteína al 4% p/p.
- También en una realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene una actividad antioxidante. Preferiblemente, se mide que la actividad antioxidante del hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene un porcentaje de eliminación del 54% al 60% en peso en una solución de proteína al 1,5% en peso.
- El hidrolizado de proteína de suero de la leche puede comprender otros ingredientes además de la proteína, por ejemplo, hidratos de carbono, lípidos y minerales.
- En una realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende lípidos en una cantidad del 8% en peso o menos basado en el contenido de sólido total, tal como el 6% en peso o menos basado en el contenido de sólido total. En otra realización, el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende lípidos en una cantidad del 1% en peso o menos basado en el contenido de sólido total, tal como un contenido de lípidos del 0,5% en peso o menos basado en el contenido de sólido total.
- El hidrolizado de proteína de suero de la leche también puede comprender minerales, tales como potasio, sodio y calcio.
- En una realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende potasio en una cantidad del 3,0% en peso o inferior.
- En otra realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende sodio en una cantidad del 2% en peso o inferior.
- En otra realización más de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende ácido cítrico en una cantidad en el intervalo de 4 g a 10 g por kg de contenido de sólido del hidrolizado de proteína de suero de la leche.
- En una realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende albúmina sérica bovina (BSA) intacta o no degradada en una cantidad del 0,5% al 2% en peso basada en el contenido total de proteína.
- En una realización preferida de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche está en forma de una composición seca, tal como un polvo o granulado.
- En otra realización, el hidrolizado de proteína de suero de la leche es una composición líquida.
- ### Productos alimenticios
- Un aspecto, no cubierto por la invención reivindicada, se refiere a proporcionar un producto alimenticio que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención.
- El producto alimenticio puede ser, por ejemplo, uno cualquiera seleccionado del grupo de productos lácteos, incluyendo una bebida, un batido, un gel, una barrita alimenticia, un concentrado o una inyección líquida.
- El producto alimenticio se selecciona del grupo de una bebida proteica, una inyección proteica, un batido proteico, un gel proteico o una barrita proteica.
- El producto alimenticio también puede ser una fórmula infantil u otros productos de nutrición infantil. Si el producto alimenticio está en forma líquida, tal como una bebida, un batido, un gel o una inyección, el producto alimenticio puede comprender el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención. El hidrolizado de proteína de suero de la leche está presente preferiblemente en la bebida en una cantidad correspondiente del 2% al 25% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada, preferiblemente del 3% al 20% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada, tal como del 3% al 15% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada, incluso más preferiblemente del 3% al 10% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada.
- Si el producto alimenticio es una barrita, tal como una barrita de proteína, el producto alimenticio comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en una cantidad correspondiente al intervalo del 2% al 30% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada. Preferiblemente, la cantidad de hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención está presente en una barrita en una cantidad correspondiente del 3% al 20% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada, tal como del 4% al 15% en peso. Si el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención se usa en una barrita alimenticia, tal como, por ejemplo, una barrita de proteína, el hidrolizado de proteína de suero de la leche se puede usar como suavizante. Es bien sabido que el aumento de las concentraciones de hidrolizado de proteínas en las barritas de proteína tiene un efecto suavizante y evita el endurecimiento de las barritas durante el almacenamiento a largo plazo.

Un aspecto adicional, no cubierto por la invención reivindicada, se refiere a proporcionar una bebida que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en una cantidad correspondiente del 2% al 20% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada. La bebida puede ser, por ejemplo, una bebida proteica que, además de proteínas, comprenda hidratos de carbono, vitaminas y minerales.

5 La bebida tiene un pH neutro, es decir, un pH en el intervalo de 6,5 a 8,0 en una solución de proteína al 4% a 22 °C.

En una realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención puede usarse como ingrediente en la preparación de una bebida carbonatada. Por tanto, el producto alimenticio de la invención que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención es una bebida carbonatada.

10 Una realización adicional de la invención se refiere a una bebida carbonatada que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención.

En una realización, la bebida carbonatada comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche en una cantidad correspondiente al intervalo del 2% al 10% en peso. La bebida carbonatada también puede comprender hidratos de carbono, y si los hidratos de carbono están presentes, es en una cantidad del 5% en peso o inferior. La bebida carbonatada preferiblemente no comprende grasa.

En una realización, la cantidad de carbonatación en una bebida carbonatada que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención es de 0,1 volúmenes de carbonatación (por volumen de líquido presente en la bebida) a 4 volúmenes de carbonatación. Más típicamente, la cantidad de carbonatación es de aproximadamente 1,6 volúmenes a aproximadamente 3,5 volúmenes, siendo la concentración más típica de aproximadamente 1,7 volúmenes a aproximadamente 3,0 volúmenes, y la cantidad de carbonatación está lo más preferiblemente en el intervalo de 2,0 a 3,0 volúmenes. En el contexto de la presente invención, por carbonatación se entiende añadir dióxido de carbono a una mezcla de ingredientes para la bebida en una cantidad suficiente para obtener una bebida proteica carbonatada en la que la cantidad de carbonatación presente en la bebida es de 0,1 volúmenes a 4 volúmenes por volumen de mezcla líquida.

25 En algunas realizaciones del método, el dióxido de carbono se añade en forma de agua carbonatada estéril. En otras realizaciones, se hace burbujear dióxido de carbono estéril a través de la mezcla líquida hasta que esté presente la cantidad deseada de dióxido de carbono.

La carbonatación aumenta la acidez de una bebida. Cuanto más dióxido de carbono se añada a una bebida, menor será el valor de pH de la bebida. Sin embargo, los autores de la presente invención han descubierto que la adición de dióxido de carbono disminuirá el pH de la bebida hasta un mínimo de pH 5,5-6,0 a una temperatura de 5 °C. La adición de aproximadamente 2,5 a 3,0 volúmenes de dióxido de carbono por volumen de bebida dio como resultado una reducción del pH de la bebida a aproximadamente pH 6,0 a una temperatura de 5 °C, mientras que la adición de aproximadamente 4 volúmenes de dióxido de carbono por volumen de bebida dio como resultado una reducción del pH de la bebida a aproximadamente pH 5,5 a una temperatura de 5 °C.

35 Por tanto, en una realización de la invención, la bebida carbonatada que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención tiene, a una temperatura de 5 °C, un pH de al menos 5,5. El pH estará típicamente en el intervalo de 5,5 a 8,25, tal como en el intervalo de 5,5 a 7,0, preferiblemente un pH en el intervalo de 5,8 a 6,5. Se prefiere una bebida carbonatada que tenga un pH superior a 5,5.

La bebida carbonatada que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención puede, por ejemplo, tratarse térmicamente, tal como, por ejemplo, pasteurizarse o esterilizarse en autoclave. Los autores de la presente invención han descubierto que la turbidez de una bebida carbonatada que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención no cambia después del tratamiento térmico a temperaturas de hasta 120 °C durante un período de tiempo prolongado, tal como, por ejemplo, 20 minutos.

45 En una realización adicional de la invención, una bebida carbonatada puede comprender el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en combinación con un aislado de proteína de suero de la leche no hidrolizado.

El hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención también se puede usar en la preparación de una inyección de proteínas, un batido de proteínas o un gel de proteínas. La inyección, el batido o el gel de proteínas puede comprender, además de proteína de suero de la leche hidrolizada, en una cantidad del 2% al 20% en peso, hidratos de carbono, vitaminas y minerales. El pH de la inyección de proteínas, el batido de proteínas o el gel de proteínas es preferiblemente neutro, es decir, un pH en el intervalo de 6,5 a 8,0.

En aspectos adicionales, la invención se refiere al uso de los hidrolizados de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención como ingrediente alimentario. El hidrolizado de proteína de suero de la leche se puede añadir a cualquier tipo de producto alimenticio como ingrediente alimentario. Preferiblemente, el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención se usa como ingrediente alimentario en la preparación de bebidas frías o calientes.

En una realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche se usa como ingrediente alimentario en la preparación de bebidas estables a UHT que tienen un pH en el intervalo de 6,5 a 8,5.

En otra realización de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche se usa como ingrediente alimentario en la preparación de bebidas usadas para la nutrición deportiva. En el contexto de la presente invención, el término "nutrición deportiva" se refiere a la nutrición adecuada en relación con el ejercicio o el entrenamiento, es decir, para desarrollar masa muscular.

En otra realización más de la invención, el hidrolizado de proteína de suero de la leche se usa como ingrediente alimentario en la preparación de bebidas clínicas. En el contexto de la presente invención, el término "bebida clínica" se refiere a bebidas que tienen una indicación clínica o médica. Por ejemplo, una bebida clínica podría tener un efecto relacionado con la salud. Una bebida clínica suelen usarla personas hospitalizadas o de edad avanzada con dificultades nutricionales o personas que requieren proteínas predigeridas para recuperarse de una afección. Por ejemplo, una bebida clínica podría ser una bebida usada para personas que padecen desnutrición o malabsorción. La bebida clínica también podría ser para personas que padecen enfermedades gastrointestinales. En el contexto del presente contexto, los términos "bebida clínica" y "bebida medicinal" tienen el mismo significado.

Una bebida clínica podría comprender, por ejemplo, el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención en una cantidad correspondiente a la bebida que comprende del 2% al 20% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada. La bebida clínica puede comprender hidratos de carbono en una cantidad del 5% al 50% en peso de la bebida. La cantidad de hidratos de carbono puede estar, por ejemplo, en el intervalo del 10% al 40% en peso, tal como del 15% al 35% en peso. La bebida clínica también puede comprender grasa. Por ejemplo, el contenido de grasa en la bebida clínica podría estar en el intervalo del 2% al 30% en peso, tal como del 3% al 20% en peso, más preferiblemente del 3% al 18% en peso.

En un ejemplo, la bebida clínica comprende proteína de suero de la leche hidrolizada de acuerdo con la invención que corresponde a una cantidad del 4% al 10% en peso, del 3% al 15% en peso de grasas y del 10% al 35% en peso de hidratos de carbono.

La bebida clínica tiene preferiblemente un valor de pH neutro, es decir, un pH en el intervalo de 6,5 a 8,0.

La bebida clínica puede estar en forma de una bebida clara, una bebida lechosa, una alimentación por sonda o en forma de un polvo para reconstituirse en un líquido.

En una realización, el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención también se puede usar en la preparación de bebidas tipo zumo. La bebida tipo zumo comprende preferiblemente la proteína de suero de la leche hidrolizada de acuerdo con la invención en una cantidad correspondiente al 4-10% en peso de proteína, al 0-1% en peso de grasa y al 15-35% en peso de hidratos de carbono.

Si la bebida clínica está en forma de alimentación por sonda, puede comprender de un 4% a un 15% en peso de proteína de suero de la leche hidrolizada de acuerdo con la invención, aproximadamente de un 5 a un 35% en peso de hidratos de carbono y aproximadamente de un 3 a un 15% en peso de grasas.

El hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención también se puede usar en nutrición infantil, tal como en fórmulas infantiles. En el contexto de la presente invención, el término "fórmula infantil" se refiere a cualquier tipo de fórmula infantil, incluida la fórmula de seguimiento, la fórmula para adultos y la fórmula prematura.

Si el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención se usa en una fórmula infantil, el contenido de proteína en la fórmula infantil está en el intervalo de 1,6 g a 5,0 g/100 kcal. Además del hidrolizado de proteína de suero de la leche, la fórmula infantil también puede comprender hidratos de carbono, tales como lactosa, oligosacáridos, lípidos, vitaminas y minerales.

El hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención también se puede usar en la preparación de otros alimentos infantiles distintos de las fórmulas infantiles, por ejemplo, en batidos, gachas de avena y similares.

El hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención también se puede usar en la preparación de una emulsión. Típicamente, se preparará una emulsión reconstituyendo un polvo del hidrolizado de proteína de suero de la leche en un líquido, por ejemplo, agua o leche, y grasas. El hidrolizado de proteína de suero de la leche tendrá un efecto emulsionante sobre el agua y las grasas. El polvo típicamente comprenderá el hidrolizado de proteína de suero de la leche en una cantidad correspondiente al intervalo del 5% al 15% en peso de proteína. Tras la reconstitución, la emulsión comprende proteína en una cantidad del 2% al 4% en peso.

La hidrólisis de las proteínas provoca cambios en la proteína, tales como un aumento en el número de grupos cargados, una disminución en el peso molecular promedio y la exposición de los grupos reactivos. Estos son factores que influyen en las capacidades de formación de emulsiones y estabilización de la emulsión de los hidrolizados de proteínas. Los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la presente invención se pueden usar como agentes

emulsionantes, estabilizadores, etc. combinándolos con otros ingredientes.

Los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención también se pueden usar en productos de panadería, por ejemplo, en bizcochos, galletas y galletas saladas.

En aspectos adicionales, la invención se refiere al uso de los hidrolizados de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención como antioxidante. Los autores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención tiene un efecto antioxidante. Por tanto, el hidrolizado de proteína de suero de la leche se puede usar en composiciones nutricionales como fuente de péptidos antioxidantes.

Por tanto, la presente invención se refiere a un hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención que tiene un efecto antioxidante. Más particularmente, la presente invención se refiere a un hidrolizado de proteína de suero de la leche que tiene un efecto antioxidante definido por un porcentaje de eliminación del 54% al 60% en una solución que comprende un 1,5% en peso de proteína. El porcentaje de eliminación se mide mediante el ensayo DPPH (hidrato de 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo). El porcentaje de eliminación se calcula como $100 \times (A_0 - A_s) / A_0$, donde A_0 es la absorción en ausencia de muestra y A_s es la absorbancia en presencia de la muestra.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Métodos de análisis

Ejemplo 1.1: Determinación del grado de hidrólisis (GH)

El grado de hidrólisis (GH) se define como el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos por hidrólisis, véase la ecuación (1) a continuación. El valor GH proporciona información sobre el número de péptidos formados, que está relacionado con el número de enlaces peptídicos disponibles.

El GH de los hidrolizados de proteína de suero de la leche se midió como se describe en Adler-Nissen, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Food Chem. 27, 1256-1262 (1979). y Nielsen, P. M., Petersen, D. y Dambmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. J. Food Sci. 66, 642-646 (2001).

En la ecuación (1), h representa el número de enlaces peptídicos escindidos y h_{total} representa el número total de enlaces peptídicos disponibles. Así, el GH proporciona el porcentaje de enlaces peptídicos escindidos.

Ecuación (1):
$$\text{GH} = (\text{número de terminales amino libres}) / (\text{número total de enlaces peptídicos disponibles}) \cdot 100\% = h / h_{\text{total}} \cdot 100\%$$

Los grupos alfa-amino libres formados después de la hidrólisis reaccionan con el o-ftalaldehído (OPA) y forman un complejo amarillo que absorbe la luz a 340 nm y, por lo tanto, se puede medir espectrofotométricamente. En función de la formación del color, se puede calcular el GH.

Los hidrolizados se resuspendieron en agua a concentraciones apropiadas (0,03-0,08% de proteína) y se hicieron reaccionar 2 volúmenes durante 2 minutos a 25 °C con 15 volúmenes de reactivo OPA ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, 100 mM, dodecilsulfato de sodio al 0,1%, DL-ditioreitol 6 mM, o-ftalaldehído 6 mM y alcohol etílico al 2%). Se hicieron reacciones similares para crear series de concentraciones de L-serina. A continuación, se midió la absorbancia a 340 nm (A_{340}) y se restó la señal A_{340} de la reacción de OPA con agua. Para encontrar el GH verdadero, los equivalentes de serina medidos en los sobrenadantes se corrigieron según lo sugerido por Adler-Nissen para el método del ácido trinitrobenzenosulfónico (Adler-Nissen J; Agricultural and Food Chemistry, 1979 27 (6) 1256), que proporciona la misma respuesta que el método OPA descrito. Los factores usados para los hidrolizados de proteína de suero de la leche fueron $a = 1$, $b = 0,4$, $h_{\text{total}} = 8,8$.

Ejemplo 1.2: Determinación de la turbidez

La turbidez nefelométrica de los hidrolizados de proteína de suero de la leche se usa como medida de la claridad y la transparencia. Si la turbidez nefelométrica medida es inferior a 100 NTU en una solución de proteína al 4% p/p, la muestra se percibe como transparente. Además, si la turbidez nefelométrica medida es inferior a 40 NTU en una solución de proteína al 4% p/p, la muestra se percibe como clara.

Al medir la turbidez nefelométrica, se diluye una muestra a 5 concentraciones diferentes de proteína, 1,8%, 3,2%, 4,8%, 6,4% y 8%, y la turbidez nefelométrica se mide con un Turbiquant 3000 IR de Merck.

Ejemplo 1.3: Determinación de la proteína total

El contenido total de proteínas (equivalentes de proteínas) de una muestra se determina mediante:

1) Determinación del nitrógeno total de la muestra según la norma ISO 8968-1/2 IDF 020-1/2-Leche.

Determinación del contenido de nitrógeno. Parte 172: Determinación del contenido de nitrógeno mediante el método de Kjeldahl.

2) Calcular la cantidad total de proteína como: $N \times 6,38$

Ejemplo 1.4: Determinación del contenido total de aminoácidos

- 5 El análisis de la composición de aminoácidos proporciona información detallada sobre el hidrolizado de proteínas como fuente de suplementación de aminoácidos.

El contenido total de aminoácidos se midió mediante el método de la norma ISO 13903:2005, UE 152/2009. Se hidrolizó una muestra en ácido clorhídrico acuoso para romper los enlaces peptídicos de la muestra. Tras la hidrólisis, se ajustó el pH de la muestra, se llevó a volumen y se filtró. Los aminoácidos se separaron en un analizador de aminoácidos y la detección se llevó a cabo mediante derivatización poscolumna usando reactivo de ninhidrina y se midió a 440 nm y 570 nm. Para la cuantificación, se usó una calibración de 1 punto. Para garantizar la calidad, se analizó un estándar interno en cada ejecución.

La cist(e)ina y la metionina deben oxidarse antes de analizarse en el analizador de aminoácidos. Las muestras se oxidaron con peróxido de hidrógeno y ácido fórmico a temperatura fría, seguido de hidrólisis ácida usando ácido clorhídrico acuoso. El proceso de oxidación oxida la metionina y la cisteína, evitando la pérdida durante la hidrólisis. Tras la hidrólisis, la muestra se analizó como se ha descrito anteriormente. Cuantificación del triptófano total: El triptófano se analizó mediante otro método, porque el triptófano no se puede cuantificar de la misma manera que los demás aminoácidos, ya que se destruye durante la hidrólisis ácida de las proteínas. En su lugar, la muestra se hidrolizó mediante tratamiento alcalino y se cuantificó mediante análisis de HPLC. Los resultados para cada uno de los aminoácidos se normalizan con respecto a la cantidad total de aminoácidos encontrados: (g/100 g de aminoácidos).

Ejemplo 1.5: Determinación del contenido de aminoácidos libres

Los aminoácidos libres en los hidrolizados de proteína de suero de la leche se determinan mediante los métodos de R. Schuster, "Determination of Amino Acids in Biological, Pharmaceutical, Plant and Food Samples by Automated Precolumn Derivatization and HPLC", Journal of Chromatography, 431:271-284 (1988) y Henderson, J.W., Ricker, R.D. Bidlingmeyer, B.A., Woodward, C., "Rapid, Accurate, Sensitive, and Reproducible HPLC Analysis of Amino Acids, Amino Acid Analysis Using Zorbax Eclipse-AAA columns and the Agilent 1100 HPLC," Agilent Publication, 2000.

Los aminoácidos libres se determinan extrayendo los aminoácidos en una solución acuosa o ácida. Las muestras pueden desproteínarse mediante filtración por peso molecular. Las muestras se analizan mediante HPLC después de la derivatización previa a la inyección. Los aminoácidos primarios se derivatizan con o-ftalaldehído y los aminoácidos secundarios se derivatizan con clorofomato de fluorenilmetilo antes de la inyección. Los resultados se presentan de la siguiente manera:

[mg de aminoácido libre/100 g de proteína de suero de la leche hidrolizada en polvo]

Ejemplo 1.6: Método para determinar la distribución de péptidos en los hidrolizados de proteína de suero de la leche

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para analizar la distribución del peso molecular de los péptidos en el hidrolizado de proteína de suero de la leche. La SEC se usa para separar las moléculas de tipo polímero por tamaño. Una mezcla de componentes de diferente tamaño, en este caso péptidos, puede separarse mediante SEC. El tiempo de elución depende del tamaño de la molécula. Cuanto más pequeña sea la molécula, mayor será el tiempo de elución.

Las muestras se disolvieron en la fase móvil a una concentración del 0,5% p/v. Antes de la inyección, la muestra se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. La separación cromatográfica se realizó en tres columnas TSK G2000 SWXL (125 Å, 5 µm, 7,5 mm x 300 mm) unidas en serie. Se usó un tampón de tampón de fosfato 0,0375 M, cloruro de amonio 0,375 M, ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% y acetonitrilo al 25% (CH₃CN) como fase móvil con un flujo de 0,7 ml por minuto. La detección de los péptidos se realizó usando un detector UV que mide a 214 nm.

En función del tiempo de retención, la distribución de los péptidos se divide de acuerdo con el tamaño y la cantidad relativa se proporciona de acuerdo con el peso molecular.

Ejemplo 2: Cribado de combinaciones de enzimas

Se probaron un total de 55 combinaciones de enzimas diferentes para su uso en la hidrólisis enzimática de proteínas del suero de la leche. Los hidrolizados de proteína de suero de la leche obtenidos se analizaron con respecto a la claridad, el amargor, el grado de hidrólisis y la composición peptídica. Los ensayos de hidrólisis se hicieron en una escala de 0,5 litros.

Las enzimas usadas para probar diferentes combinaciones de enzimas fueron las serina endopeptidasas de *Bacillus* (EC 3.4.21.62), las serina endopeptidasas de *Aspergillus* (EC 3.4.21), la proteasa similar a la tripsina de origen microbiano (EC 3.4.21.4), la aminopeptidasa de *Aspergillus* (EC 3.4.11) y la metaloendopeptidasa de *Bacillus*

amyloliquefaciens (EC 3.4.24.28), endoproteasa de *Ananas comosus* (bromelaína) (EC 3.4.22.32), una endopeptidasa específica para prolina de *Aspergillus niger* (EC: 3.4.21.26), un preparado de aminopeptidasa de *Aspergillus oryzae* (EC 3.4.11), un preparado de metaloendopeptidasa de *Geobacillus stearothermophilus* (EC 3.4.24) y un preparado de endopeptidasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (EC 3.4).

5 Las preparaciones enzimáticas usadas para el experimento fueron:

Protamex (Novozymes A/S) que comprende una serina endopeptidasa de *Bacillus* sp. (subtilisina) y bacilolisina.

Proteasa A Amano 2 SD (Amano Enzymes Ltd.), que comprende serina endopeptidasa de *Apergillus oryzae*

Promod 782 MDP (Biocatalysts Ltd.), que comprende serina endopeptidasas de *Aspergillus* sp.

Formea TL 1200 BG (Novozymes A/S), que comprende una proteasa similar a la tripsina de origen microbiano

10 Promod 950L (Biocatalysts Ltd.), que comprende serina endopeptidasas de *Bacillus* sp. (subtilisina) y bacilolisina.

Flavourzyme conc BG (Novozymes A/S), que comprende leucilaminopeptidasas de *Aspergillus oryzae*

Alcalasa AF 2,4 L (Novozymes A/S), que comprende serina endopeptidasas (subtilisina) de *Bacillus licheniformis*

Neutrassa conc BG (Novozymes A/S), que comprende metaloendopeptidasas (bacilolisina) de *Bacillus amyloliquefaciens*

15 Promod 523 MDP (bromelaína) (Biocatalysts Ltd.), que comprende cisteína endopeptidasas de *Ananas comosus*

Maxipro PSP (DSM), endopeptidasa específica para prolina de *Aspergillus niger* Flavorpro 766 (Biocatalyst Ltd.), que comprende aminopeptidasas de *Aspergillus oryzae*

Thermoase PC10F (Amano Enzymes Ltd.), que comprende metaloendopeptidasa de *Geobacillus stearothermophilus*

20 Protin NY100 (Amano Enzymes Ltd.), que comprende endopeptidasas de *Bacillus amyloliquefaciens*, se usaron 55 combinaciones de enzimas en la hidrólisis de la proteína de suero de la leche. Como sustrato para la hidrólisis, se usó una solución de un aislado de proteína de suero de la leche (PSL) (Lacprodan DI-9224 de Arla Food Ingredients). La solución de PSL para todos los experimentos tenía una concentración de proteína del 8% en peso. La reacción de hidrólisis se realizó a 50 °C, con pH-Stat a pH = 7 y un tiempo de reacción de 6 horas después de añadir la primera enzima. Después de 6 horas de hidrólisis, la hidrólisis se detuvo calentándola a 99 °C con un tiempo de mantenimiento de 90 segundos para inactivar las enzimas. La cantidad de enzimas usada se menciona en la Tabla 1 como la cantidad de enzima en gramos por 100 gramos de proteína. El producto de cada ensayo de hidrólisis se liofilizó y se usó para análisis adicionales que incluían la claridad (en forma de medidas de turbidez), el grado de hidrólisis y la evaluación y puntuación del sabor. Los resultados se muestran en la Tabla 1 a continuación:

30 NEU: se refiere a Neutrassa

FZ: se refiere a Flavourzyme conc BG

Alca: se refiere a Alcalase AF 2.4 L

PA: se refiere a la proteasa A Amano 2 SD

FTL: se refiere a Formea TL 1200 BG

35 PM782: se refiere a Promod 782 MDP

FP766: se refiere a Flavourpro 766

MP PSP: se refiere a Maxipro PSP

THER: se refiere a Thermoase PC10F

PRO: se refiere a Protin NY100

40 PM950: se refiere a Promod 950L

PTM: se refiere a Protamex

Las enzimas usadas para los ensayos presentados en la Tabla 1 se seleccionaron entre un mayor número de enzimas basándose en ensayos a escala de 96 pocillos. Estos ensayos incluyeron la hidrólisis con diferentes combinaciones de enzimas y la puntuación visual de la claridad aparente y la estabilidad térmica y la hidrólisis (SDS-PAGE). Para permitir la hidrólisis estática del pH y mayores cantidades de material para el análisis, las combinaciones presentadas

45

en la Tabla 1 se hicieron en una escala de 500 ml como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, las enzimas presentadas en la Tabla 1 no se seleccionaron aleatoriamente. Algunas de las combinaciones de enzimas de la Tabla 1 se repitieron a diferentes dosis (por ejemplo, la combinación 1-3).

El término "Visual d inact." En la Tabla 1 se refiere a "visual" después de la inactivación.

Tabla 1

ID de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Enz 1 (dosis)	PTM 0,156	PTM 0,312	PTM 0,625	PTM 0,625	PA 0,312	PA 0,312	0,312 PA	PTM 0,312	PTM 0,312	PM 950 3,125	Alca 1,05	PA 0,312	PA 0,312	THER 0,312
Enz 2 (dosis)	PA 0,156	PA 0,312	PA 0,625	PM78 2 0,312				PA 0,312	PA 0,312	PA 0,312	PA 0,312	FTL 0,312	FTL 0,312	PA 0,312
Enz 3 (dosis)	FTL 0,156	FTL 0,312	FTL 0,625	FTL 0,625	FTL 0,312	FZ 0,312	FP766 0,312	FZ 0,312	FZ 0,312	FZ 0,312	FZ 0,312	FZ 0,312	FP766 0,312	FZ 0,312
Visual d' inact.	clara	clara	clara	clara	clara	turbia	turbia	turbia	turbia	clara	clara	clara	clara	turbia
GH, %				22,1						31,5	31,5			
Sabor amargo	4%	4%	4%	>4%	4%	4%	4%	8%	8%	8%	8%	4%	4%	8%
>2500 Da (5%)	36,4	28,6	20,9	17,6	34,5	27,7	41	21,1	33,7	11,7	9,6	17,8	21,2	20,7

ID de muestr	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Enz 1	PRO	PM78	PM78	PM78	PM78	PM78	PM78	PM78	Neu	Neu	Neu	Neu	Neu	Neu
(dosis)	0,312	2	2	2	2	2	2	2	0,219	0,219	0,219	0,219	0,219	0,219
		0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625						
Enz 2	PA	FTL	FTL	FTL	FTL	FTL	FTL	FTL	PM52	Aica	PM95	PM52	PM52	PM52
(dosis)	0,312	0,625	0,624	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	3	0,625	0	3	3	3
									6,25		0,625	0,625	0,625	0,625
Enz 3	FZ	FZ	FP766	FZ	FP	FZ	FZ	FZ	PM78	PM78	PM78	MPPS	MPCP	
(dosis)	0,312	0,625	0,625	0,625	766	0,625	0,625	0,625	2	2	2	P	P	
					0,625				0,625	0,625	0,625	6,25	6,25	
Visual d inact.	turbia	gel	gel	clara	turbia	clara	turbia	blanca	clara	turbia	turbia	clara	gel	clara
GH, %		22,6	16,6	34,7	18,8	52,4	55,4	54,5	18,7	24,5	21,7	14,7	16,3	15,3
Sabor amargo	8%	n/a	n/a	4%	8%	4%	4%	8%	4%	2%	4%	4%	4%	8%
>2500 Da (5%)	31,9	36,0	40,5	15,8	27,6	19,2	16,5	17,7	26,9	5,4	14,6	26,8	20,8	24,6

ID de muestr	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Enz 1 (dosis)	Neu 0,219	Neu 0,219	Neu 0,129	Neu 0,219	Neu 0,219	PM52 3 0,625	PM52 3 0,625	PM52 3 0,625	PM52 3 0,625	PTM 0,625	PTM 0,625	PTM 0,625	PM52 3 0,625	Neu 0,219
Enz 2 (dosis)	PM78 2 0,625	PM52 3 0,625	PM52 3 0,625	MPPS P 6,25	PM52 3 0,625	PM14 4 0,625	Alca 6,25	PM95 0 6,25	PTM 0,625	PM52 3 0,625	PM78 2 0,625	MPPS P 6,25	Neu 0,219	PM52 3 0,625
Enz 3 (dosis)	FZ 0,125	FZ 0,125	FTL 0,0625	PM78 2 0,625	FP766 0,625	PM78 2 0,625	FP782 0,625	PM78 2 0,625	PM78 2 0,625	Neu 0,219	Neu 0,219	Neu 0,219	FZ 0,0625	FZ 0,0625
Visual d' inact.	turbia	clara	turbia	clara	clara	clara	blanca	blanca	clara	turbia	turbia	clara	clara	clara
GH, %	25,4	25,6	18,8	20,5	19,6	15,8	24,4	22,5	18,8	17,9	20,8	14,5	22,8	22,4
Sabor amargo	8%	8%	8%	8%	8%	8%	2%	4%	8%	4%	4%	2%	n/a	n/a
>2500 Da (5%)	26,7	15,3	14,1	15,8	17,8	20,8	3,5	8,5	24,3	17,3	27,3	48,9	19,3	35,2

ID de muestra	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
Enz 1 (dosis)	Neu 0,219	Neu 0,219	PTM 0,625	PTM 0,625	PM523 0,625	Neu 0,219	Neu 0,219	Neu 0,219	PTM 0,625	Neu 0,219	Neu 0,219	Neu 0,219	PTM 0,62
Enz 2 (dosis)	PTM 0,625	MPPSP	Neu 0,219	Neu 0,219	Neu 0,219	PM782 0,625	PTM 0,625	MPPSP 6,25	Neu 0,219	PM523 0,625	PM782 0,625	MPPSP 6,25	Neu 0,219
Enz 3 (dosis)	FZ 0,0625	FZ 0,0625	FZ 0,0625	PM782 0,625	FP766 0,625	FP766 0,625	FP766 0,625	FP766 0,625	FP766 0,625	PTM 0,625	PTM 0,625	PTM 0,625	MPPSP 6,25
Visual d inact.	clara	turbia	turbia	turbia	clara	turbia	clara	clara	clara	turbia	turbia	clara	clara
GH, %	19,9	17,7	17,9	8,1	8,1	8,2	8,1	16,3	17,3	18,3	23,6	14,9	15,5
Sabor amargo, %	4%	4%	4%	4%	8%	8%	4%	8%	4%	8%	6%	8%	8%
>2500 Da (5%)	28,7	42,6	34,3	28,7	22,1	26,6	33,6	45,3	37,0	15,3	26,7	43,4	39,7

Los datos se evaluaron para cada hidrolizado de proteína de suero de la leche. Para una evaluación positiva, deben cumplirse las siguientes condiciones:

- aspecto claro después de la inactivación de la enzima
- con un alto grado de hidrólisis superior al 15%, y preferiblemente superior al 20%
- 5 – sin sabor amargo en una solución de proteína al 4% p/p
- el 25% en peso o menos de los péptidos debe tener un peso molecular superior a 2500 Da

Las muestras deben estar claras después de 90 segundos a 99 °C, ya que esto es indicativo de la estabilidad a la UHT (estable y clara tras el tratamiento de una solución al 4% a 143 °C durante 6 segundos).

- 10 Por tanto, se puede observar en las tablas anteriores que 4 de las 55 combinaciones de enzimas, es decir, las muestras denominadas muestras 4, 10, 11 y 30, cumplan las condiciones.

La muestra 4 se obtuvo por hidrólisis con una combinación de las enzimas serina endopeptidasa de *Bacillus*, serina endopeptidasa de *Aspergillus* y proteasa similar a la tripsina.

- 15 La muestra 10 se obtuvo por hidrólisis con una combinación de las enzimas serina endopeptidasa de *Bacillus*, metaloendopeptidasa de *Bacillus*, serina endopeptidasa de *Aspergillus* y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*. La muestra 11 se obtuvo por hidrólisis con serina endopeptidasa de *Bacillus*, serina endopeptidasa de *Aspergillus* y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*.

La muestra 30 se obtuvo por hidrólisis con bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, bromelaína y leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*.

Ejemplo 3: Análisis adicional de los hidrolizados de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención

- 20 Los cuatro hidrolizados de proteína de suero de la leche del ejemplo 2 que cumplan las condiciones de claridad, sabor, grado de hidrólisis y distribución de péptidos se analizaron más a fondo y se mencionaron como muestra 1-4 (S1-S4) en la siguiente tabla.

Las muestras 5-12 (S5-S12) son hidrolizados de proteína de suero de la leche procedentes de la hidrólisis con otras combinaciones de enzimas.

- 25 La muestra 13 (S13) es un hidrolizado de PSL secado por pulverización obtenido por hidrólisis de suero dulce con una combinación de subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Alcalasa) y bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (Neutrase), seguida de ultrafiltración, tratamiento con carbón activado y microfiltración para eliminar el carbón activado (como se describe en el documento WO 1993/024020A1). El grado de hidrólisis es de aproximadamente el 25%.

- 30 La muestra 14 (S14) se prepara usando la misma combinación de enzimas que en la muestra 4 (combinación de enzimas de la invención), pero donde se usa un CPSL como sustrato para la hidrólisis.

Las muestras 15 y 16 (S15-S16) son réplicas de la muestra 4. Las muestras 15 y 16 son hidrolizados basados en PSL preparados sin filtración por UF usando las mismas condiciones que en la muestra 4.

- 35 Los hidrolizados de proteína de suero de la leche hechos mediante hidrólisis enzimática con diferentes combinaciones de enzimas se analizaron nuevamente para determinar su claridad, el grado de hidrólisis y el contenido de péptidos que tenían un peso molecular superior a 2500 Da y el contenido de péptidos que tenían un peso molecular inferior a 375 Da.

La claridad (turbidez) de las muestras se determinó mediante mediciones de acuerdo con el ejemplo 1.2 y la turbidez nefelométrica debe ser inferior a 40 NTU para que la muestra se perciba como clara e inferior a 100 NTU para que la muestra se perciba como transparente.

- 40 Se puntuó que una muestra era amarga si se percibía un sabor amargo con un 4% de proteína o menos.

El grado de hidrólisis se midió mediante el método descrito en el ejemplo 1.1, mientras que el amargor se midió probando la muestra en diferentes concentraciones (concentración de proteína del 2%, el 4%, el 8%). La distribución de los péptidos se midió como se describe en el ejemplo 1.5. El resultado se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2

	Origen	Combinación de enzimas	Clara (turbidez nefelométrica a un 4% p/p de proteína inferior a 40 NTU)	Amargo al porcentaje de proteína	GH,%	>2500 Da (%)	<375 Da (%)
S1	PSL	Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i> Leucilaminopeptidasa	Sí	8	31,5	11,7	20,4
S2	PSL	Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i> Proteasa similar a la tripsina	Sí	>4	31,5	17,6	13,5
S3	PSL	Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i> Leucilaminopeptidasa	Sí	8	22,1	9,6	22,2
S4	PSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Bromelaína leucilaminopeptidasa	Sí	8	25,6	15,3	14,4
S5	PSL	Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i> Proteasa tipo tripsina Leucilaminopeptidasa	No	8	18,9	27,6	8,7
S6	PSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i>	No	2	24,6	5,4	21
S7	PSL	Bromelaína Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Metalloendopeptidasa de <i>Bacillus</i>	Sí	8	18,9	24,5	9,9
		Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i>					
S8	PSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i>	No	4	21,7	14,6	13,8
S9	PSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i> Leucilaminopeptidasa	No	8	23,4	26,7	13,8

	Origen	Combinación de enzimas	Clara (turbidez nefelométrica a un 4% p/p de proteína inferior a 40 NTU)	Amargo al porcentaje de proteína	GH,%	>2500 Da (%)	<375 Da (%)
S10	PSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Endopeptidasa específica de prolilo Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i>	Sí	8	20,5	28,4	24,3
S11	PSL	Bromelaína Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i>	No	2	24,4	1,9	54,5
S12	PSL	Bromelaína Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Serina endopeptidasa de <i>Aspergillus</i>	No	4	22,5	8,5	16,6
S13	CPSL	Serina endopeptidasa de <i>Bacillus</i> Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	No	>2	23,0	7,5	18,9
S14	CPSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Bromelaína	No	8	25,4	23,2	15
		Leucilaminopeptidasa					
S15	PSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Bromelaína leucilaminopeptidasa	Sí	8	23,0	23,2	12,7
S16	PSL	Bacilolisina de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Bromelaína leucilaminopeptidasa	Sí	8	23,0	17,9	13,5

Por tanto, en la Tabla 2, se muestra que el uso de combinaciones enzimáticas específicas de acuerdo con la presente invención da como resultado hidrolizados de proteína de suero de la leche que 1) tienen un grado de hidrólisis superior al 20%, 2) del 8% al 25% de los péptidos tienen un peso molecular de 2500 Da o superior y 3) no tienen sabor amargo a una concentración de proteína del 4% o inferior.

Es más, en la Tabla 2 se muestra que, si se usa una PSL para la hidrólisis de proteínas, el uso de las combinaciones enzimáticas específicas de la invención da como resultado hidrolizados de proteína de suero de la leche que tienen un aspecto claro. En la Tabla 2 también se muestra que el uso de las combinaciones enzimáticas específicas en la preparación de hidrolizados de proteína de suero de la leche en los que se usa un CPSL como sustrato da como resultado un hidrolizado de proteína de suero de la leche que tiene un grado de hidrólisis superior al 20%, del 8% al 25% de los péptidos tienen un peso molecular de 2500 Da o superior y no tienen sabor amargo a una concentración de proteína del 4% o inferior. Sin embargo, los hidrolizados de proteína de suero de la leche preparados usando un CPSL como sustrato no tienen un aspecto claro (debido a los lípidos presentes en el CPSL).

En una realización preferida de la invención, se usa una PSL como sustrato para la hidrólisis de proteínas para obtener hidrolizados claros.

Ejemplo 4: Análisis de turbidez

Se analizó adicionalmente la turbidez nefelométrica a diferentes concentraciones de proteína de las muestras 1 a 16

del ejemplo 3. Las muestras con una turbidez inferior a 100 NTU se consideraron transparentes y las muestras con una turbidez inferior a 40 se consideraron claras. En la Tabla 3 siguiente se muestran las turbideces de los hidrolizados mencionados en la muestra 1-12 en el ejemplo 3 medidas a diferentes concentraciones de proteína. Las concentraciones de proteína son el 1,8% de proteína, el 3,2% de proteína, el 4,8% de proteína, el 6,4% de proteína y el 8% de proteína. La concentración de proteína es porcentual en peso.

Los polvos de los hidrolizados de proteína de suero de la leche se hidrataron durante al menos 30 minutos a las concentraciones indicadas antes de medir las turbideces (n = 3).

Tabla 3: La turbidez (NTU) de las muestras de ensayo es de 1,8. 3,2. 4,8. 6,4% y 8% de proteína

Contenido de proteínas (% en peso)	1,8	3,2	4,8	6,4	8
Muestra 1	9,26	18,69	29,05	34,14	43,48
Muestra 2	14,46	26,86	34,38	42,45	50,15
Muestra 3	10,93	21,08	30,48	41,29	48,56
Muestra 4	11,58	23,78	33,82	43,73	63,41
Muestra 5	129,42	213,08	269,67	292,63	305,15
Muestra 6	177,24	366,35	620,99	827,23	921,99
Muestra 7	12,4	21,5	31,31	37,11	42,04
Muestra 8	86,94	186,66	254,45	336,05	399,52
Muestra 9	68,41	121,46	182,88	236,2	263,59
Muestra 10	16,5	31,52	46,38	58,8	67,4
Muestra 11	154,82	318,38	511,59	740,01	972,62
Muestra 12	114,53	228,26	334,15	435,53	575,48

Por tanto, en la Tabla 3 se muestra que las combinaciones enzimáticas específicas de acuerdo con la invención tienen una turbidez inferior a 100 NTU a concentraciones del 8% de proteína.

En la figura 1 A-C, se muestran las turbideces medidas de las muestras 13, 14 y 16. En la figura 1A se muestra la turbidez de los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la muestra 13, 14 y 16 y se muestra la diferencia de turbidez. En la figura 1A, se muestra que un hidrolizado de proteína de suero de la leche (no la invención, muestra 13) sometido a ultrafiltración tiene una turbidez muy baja (inferior a 1 NTU) y es el hidrolizado el más claro. El hidrolizado preparado de acuerdo con el método de acuerdo con la presente invención (muestra 16) usando una de las combinaciones de enzimas específicas tiene una turbidez inferior a 100 NTU a una concentración de proteína del 8% y, por lo tanto, es transparente. Asimismo, el hidrolizado de la invención tiene una turbidez inferior a 40 NTU a una concentración de proteína del 4% y, por lo tanto, se percibe como clara a una concentración de proteína del 4%. Por el contrario, el hidrolizado de proteína de suero de la leche preparado de acuerdo con la invención usando un CPSL como sustrato (muestra 14) tiene una turbidez superior a 1000 NTU y, por lo tanto, se percibe como poco claro.

En la figura 1B se muestra más claramente que la turbidez de la muestra 16 es inferior a 40 NTU a una concentración de proteína del 5% o inferior.

En la figura 1C se muestra la turbidez de la muestra 14. Se muestra que incluso a concentraciones muy bajas (alrededor del 2%), la turbidez está por encima de 2000 NTU. La muestra 14 se percibe como muy poco clara y no transparente.

Las figuras 2 A-C incluyen imágenes de las muestras 13, 14 y 16 para mostrar visualmente muestras claras frente a muestras no claras. Las muestras de izquierda a derecha se prepararon con un 8%, un 6,4%, un 4,8%, un 3,2% y un 1,8% de proteína.

En la figura 2A se muestra que la muestra 16 es visualmente clara y transparente con un 8%, un 6,4%, un 4,8%, un 3,2% y un 1,8% de proteína.

En la figura 2B se muestra la muestra 14, y se muestra que la muestra 14 no está clara y no es transparente incluso en la concentración de proteína más baja del 1,8%.

- 5 En la figura 2C se muestra la muestra 13, y se muestra que la muestra 13 es visualmente clara y transparente a todas las concentraciones.

Ejemplo 5: Evaluación del amargor en relación con la cafeína

- 10 En el ejemplo 5, se analiza el amargor de un hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención en comparación con un hidrolizado de proteína de suero de la leche tratado con carbón activado y filtrado con UF hecho mediante hidrólisis enzimática de PSL con otras enzimas distintas de las de la presente invención (hidrólisis con una subtilisina de *Bacillus licheniformis* (Alcalase) y una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (Neutrase)).

Se hizo una evaluación sensorial para comparar el sabor de las muestras 13, 15 y 16 del ejemplo 3.

- 15 Se entrenó un panel sensorial para detectar y cuantificar el amargor usando una solución de cafeína como referencia. La capacitación incluyó que los panelistas recibieran primero muestras de referencia que incluían soluciones compuestas por concentraciones crecientes de cafeína. Los panelistas se entrenaron para asignar puntuaciones de amargor a soluciones desconocidas basadas en una escala de 15 cm. Las muestras de referencia consistían en 3 soluciones de cafeína que contenían un 0,025%, un 0,05% y un 0,1% de cafeína, respectivamente. Tras evaluar las muestras de referencia, los panelistas probaron las muestras de hidrolizado 3 veces en una solución de proteína al 4% en peso en un orden aleatorio y clasificaron la intensidad amarga de las soluciones de prueba en función del amargor de las soluciones de referencia. La solución de referencia que comprendía un 0,025% de cafeína se percibió como no amarga y la solución de referencia que comprendía un 0,1% de cafeína se percibió como amarga (puntuación de 13 en una escala de amargor de 15 cm). El panel sensorial estaba compuesto por 7 panelistas que participaron en la evaluación.

- 25 Es más, se llevó a cabo un perfil sensorial de acuerdo con la norma internacional Perfil descriptivo cuantitativo ISO 13299:2016 2a ed. 5.5, anexo F1-F6 y H3 con el uso del panel. 7 evaluadores capacitados participaron en la evaluación. La evaluación se hizo en 3 repeticiones. La escala de respuesta usada fue una escala lineal continua (15 cm). Se sirvieron muestras de aproximadamente 2 ml a temperatura ambiente. Se usó luz roja durante la evaluación.

- 30 El amargor puntuado por el panel sensorial con referencia al amargor de la cafeína se muestra en la figura 3, donde la puntuación de amargor de las muestras de ensayo se representa gráficamente frente a la concentración de cafeína. El amargor de las 3 concentraciones diferentes de cafeína y las puntuaciones de amargor de las muestras 13, 15 y 16 del ejemplo 3 se muestran en la figura 3.

- 35 En la figura 3 se muestra que la muestra 13 (hidrolizado de PSL, pero no con la combinación de enzimas de la invención, sino que el hidrolizado se ultrafiltra y se trata con carbón activado) tiene el amargor relativo más alto del 0,095%. La muestra 15 (hidrolizado de PSL usando la combinación de enzimas de la invención, sin ultrafiltración ni tratamiento con carbón activado) tiene el amargor relativo más bajo de las 3 muestras de producto, con un amargor relativo del 0,054%, pero estaba bastante cerca del hidrolizado de la muestra 16 (similar a la muestra 15), que tiene un amargor relativo del 0,061% con respecto a la cafeína.

- 40 Por tanto, el sabor de los hidrolizados de proteína de suero de la leche apetecibles preparados de acuerdo con la invención (muestra 15 y muestra 16) se percibió como menos amargo que el del 0,08% de la cafeína y menos amargo que el de la muestra 13.

Ejemplo 6: Elaboración de perfiles de sabor

- 45 Se hizo un ejemplo para evaluar el perfil de sabor de los hidrolizados de proteína de suero de la leche en las muestras 13, 15 y 16. El perfil del sabor lo hizo un panel entrenado y se usaron 5 atributos para identificar las diferencias entre las muestras, centrándose en el olor, la sensación en la boca y el sabor.

- 50 Los datos se analizaron para identificar diferencias significativas entre las muestras para cada atributo. En la tabla 4 se muestra una evaluación estadística de los datos. Asimismo, se ha usado una prueba de intervalo múltiple para identificar las diferencias entre las muestras. En la Tabla 4, las muestras con la misma letra no son significativamente diferentes.

Tabla 4: Puntuaciones sensoriales

	Queso_O ***	Caldo_O***	Astringente_ MF***	Umami T ***	Amargo_T ***
Muestra 15	5,33 ^A	4,89 ^A	5,79 ^A	7,15 ^A	7,53 ^A
Muestra 13	1,4 ^B	1,14 ^B	10,71 ^B	1,54 ^B	12,3 ^B
Muestra 16	4,1 ^A	7,58 ^C	5,96 ^A	8,49 ^A	8,11 ^A
*** p < 0,001 Prueba de Duncan: Las muestras con una letra diferente para un atributo son significativamente diferentes a un nivel del 95% (p < 0,05)					

Por tanto, la puntuación de amargor de las muestras 15 y 16 es menor que la puntuación de amargor de la muestra 13.

Los datos mencionados en la Tabla 4 se pueden representar como una representación de telaraña, véase la figura 4. La telaraña muestra los atributos de olor (O), sensación en boca (MF) y sabor (T). En la periferia del gráfico se muestra la intensidad "alta" de cada atributo sensorial y la intensidad "pequeña" en el centro del gráfico. Cada producto tiene una etiqueta diferente que se muestra debajo de la figura. Como ejemplo, consulte los datos de "Amargo_T", donde *** indica que los datos de la muestra 13 y de las muestras 15 y 16 son significativamente diferentes (p < 0,001).

A partir de la representación en forma de telaraña del perfil de sabor, se muestra que la muestra 13 es muy diferente de las muestras 15 y 16 en el perfil de sabor y, lo que es más importante, las muestras 15 y 16 tienen un amargor bajo.

Ejemplo 7: Análisis mediante LC-MS/MS y patrón de escisión de péptidos

Los péptidos en muestras líquidas se pueden identificar mediante análisis peptídico espectrométrico de masas y búsqueda en bases de datos. Las muestras 1, 2, 3, 13, 15 y 16 se analizaron mediante LC-MS/MS para identificar las secuencias peptídicas y las proteínas de las que se derivaban. Los péptidos presentes en las muestras respectivas se disolvieron en agua y se inyectaron en un sistema Dionex nano-LC para el análisis de MS/MS en un espectrómetro de masas Bruker Maxis Impact QTOF. La búsqueda con los espectros de MS/MS adquiridos se hizo en una base de datos hecha a medida que contenía secuencias de proteínas de origen bovino. Los resultados generales de los análisis se ilustran en la tabla 5.

Tabla 5: Proteínas identificadas mediante LC-MS/MS

Cobertura (%)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 13	Muestra 15	Muestra 16
Beta-lactoglobulina	79,8	80,9	82,6	74,2	82	82,6
Beta-caseína	79,9	77,7	79,5	71,4	64,7	62,5
Kappa-caseína	29,5	38,9	32,6	30,5	36,3	33,2
Molécula GDCA 1*	46,4	65,4	34,6	48,4	56,2	40,5
Osteopontina	40,6	30,9	36,7	39,9	33,8	29,9
Alfa-lactalbúmina	42,3	54,2	58,5	47,2	53,5	62
alfa-S1-caseína	49,1	53,7	41,1	36	41,1	36,4
BSA**	18,9	15	21,3	10,2	8,4	10,5
alfa-S2-caseína	27	33,3	20,7	23,9	19,4	11,3
No se identificaron péptidos totales	776	917	709	631	595	615

Cobertura (%)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 13	Muestra 15	Muestra 16
*Molécula de adhesión celular dependiente de la glicosilación						1
** Albúmina sérica bovina						

Los datos de la Tabla 5 mostraron que los análisis proporcionaron una alta cobertura de secuencias para las proteínas más prevalentes en las muestras, incluidas la beta-lactoglobulina, la alfa-lactoalbúmina y la beta-caseína. Asimismo, se indica el número de péptidos identificados de cada muestra. Como los conjuntos de datos tenían la calidad esperada para el análisis LC-MS/MS, eran válidos para un análisis más detallado (ejemplo 9).

Ejemplo 8: Análisis LS-MS/MS de péptidos amargos

En primer lugar, se confirmó que los datos de LC-MS/MS del ejemplo 7 correspondían a los datos obtenidos mediante análisis SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) mediante la comparación de las distribuciones de péptidos. En este caso, los datos de la SEC se convirtieron en el número de porcentajes (el número de péptidos de un peso molecular dado) y se representaron gráficamente para cada hidrolizado junto con los mismos datos calculados en función de la LC-MS/MS (véase la figura 5). Los datos de LC-MS/MS solo incluían péptidos de la beta-lactoglobulina, mientras que el análisis SEC tuvo en cuenta todas las proteínas de las muestras.

En la figura 5, se muestra que el porcentaje de péptidos derivados de beta-lactoglobulina en el intervalo de 7-10 aminoácidos y en el intervalo de 11-19 aminoácidos del número de péptidos derivados de beta-lactoglobulina en 7-19 aminoácidos fue similar cuando se usaron LC-MS/MS y SEC.

Por tanto, los datos mostrados en la figura 5 muestran que el número de péptidos en diferentes intervalos de longitud de aminoácidos en el conjunto de datos LC-MS/MS puede usarse para extraer información cuantitativa sobre la distribución relativa de los péptidos, ya que los datos eran comparables a los datos de la SEC y el método de la SEC es cuantitativo. Es más, en la figura 5 se muestra que la muestra 13 (fuera de la invención) tenía más péptidos con un tamaño de péptido más pequeño que los hidrolizados de acuerdo con la invención.

La cantidad de péptidos detectables que comprenden fenilalanina como porcentaje del número total de péptidos se identificó y se analizó en las muestras 1, 2, 3, 13, 15 y 16 mediante MS-LC/MS. Los resultados se muestran en la figura 6.

Sin ceñirse a ninguna teoría, los autores de la presente invención creen que la presencia de fenilalanina en los péptidos está correlacionada con el amargor, y el amargor de la fenilalanina puede aumentarse cuando su terminal amino o carboxi está bloqueado por un enlace peptídico a otro residuo de aminoácido. Por ejemplo, se sugirió que el residuo de fenilalanina en el péptido amargo YPFPGIPN identificado en un hidrolizado de proteína de suero de la leche amargo era un determinante primario del amargor (Liu. X., Jiang. D. y Peterson. D.G. Identification of Bitter Peptides in whey protein hydrolysate. J. Agric. Food Chem. 2014. 62: 5719-5725).

En la figura 6 se muestra el contenido de fenilalanina en los péptidos como porcentaje del número total de péptidos que se originan a partir de la beta-lactoglobulina, la alfa-lactoalbúmina y la beta-caseína. El porcentaje de péptidos que comprenden fenilalanina fue menor para los hidrolizados menos amargos con tamaños de péptidos de menos de 9 residuos de aminoácidos. Por tanto, para el hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en las muestras 1 y 3, la fenilalanina está presente en péptidos con un tamaño de péptido mayor. Los hidrolizados de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención representados por las muestras 2, 15 y 16 también tienen un bajo porcentaje de péptidos que comprenden fenilalanina, pero, es más, las muestras 2, 15 y 16 también mostraron un porcentaje inferior de fenilalanina unida a los péptidos en general. Esto indica que puede haber más fenilalanina presente como aminoácidos libres en las muestras 2, 15 y 16 que en las muestras 1, 3 y 13. Por tanto, una indicación de los hidrolizados de proteína de suero de la leche no amargos de acuerdo con la presente invención es que un gran porcentaje de fenilalanina está presente en péptidos más grandes o está presente como aminoácidos libres.

En la figura 7 se muestra el porcentaje de péptidos de 5-19 aminoácidos de la alfa-lactoalbúmina, la beta-lactoglobulina y la beta-caseína.

En la figura 7 se muestra que la muestra 13 (fuera de la invención) comprende más péptidos pequeños (5-9 aminoácidos) que los otros cinco hidrolizados de proteína de suero. Sin pretender imponer ninguna teoría, los autores de la presente invención creen que el mayor contenido de fenilalanina que comprende péptidos de tamaños peptídicos más pequeños en el hidrolizado de la muestra 13 puede ser la razón del mayor amargor en la muestra 13 que en las muestras 1, 2, 3, 15 y 16, que son hidrolizados de acuerdo con la invención.

Ejemplo 9: Datos de distribución por tamaño de la SEC

El tamaño de los péptidos en las muestras 1, 2, 3, 13, 15 y 16 se analizó mediante cromatografía de exclusión por

tamaño (SEC). Los resultados se muestran en la tabla 6 a continuación:

Tabla 6: Datos de distribución por tamaño según la SEC, contenido de GH y aminoácidos libres (FAA) de los hidrolizados de proteína de suero de la leche de las muestras 1, 2, 3, 13, 15 y 16

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 13	Muestra 15	Muestra 16
<375 Da (%)	20,4	13,5	22,2	16,1	13	13,5
(375-750) Da (%)	20,1	24,5	24,2	35,9	20,4	22,9
(750-1250) Da (%)	18,2	15,3	20,6	24,6	17	18,8
(1250-2500) Da (%)	29,5	29,1	23,3	21,4	27,3	26,9
>2500 Da (%)	11,7	17,6	9,6	2,1	22,4	17,9
GH,%	31,5	22,1	31,5	27,7	23,3	25,4
FAA (mg/100 g de proteína (Nx6,38))	13 825	4404	12 241	413	7266	5936

- 5 Los datos de la cromatografía de exclusión por tamaño no representan con precisión los aminoácidos libres, ya que los datos se adquirieron mediante mediciones a 214 nm, donde se espera que absorban principalmente los enlaces peptídicos.

10 Por lo tanto, el contenido de aminoácidos libres se midió mediante un método diferente (véase el ejemplo 10). En comparación con el hidrolizado de proteína de suero de la leche de referencia de la muestra 13, los hidrolizados de proteína de suero de la leche de acuerdo con la presente invención tienen un mayor contenido de aminoácidos libres. Sin embargo, el contenido de péptidos pequeños es mayor en el hidrolizado de proteína de suero de la leche de referencia (muestra 13) que en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención. Por ejemplo, el contenido de péptidos de 750 Da o menos es en la muestra 13 superior al 50%. Por el contrario, el contenido de péptidos en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la presente invención que tienen un tamaño de 750 Da o menos está por debajo del 40%. Asimismo, la muestra 13 comprende menos péptidos de 2500 Da o más que los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención.

15 Cuando estos datos se comparan con los datos del ejemplo 8, resulta obvio que el bajo contenido global de fenilalanina en los péptidos derivados de beta-lactoglobulina, alfa-lactoalbúmina y beta-caseína de las muestras 2, 15 y 16 es el resultado de que estos residuos de fenilalanina se liberan de los péptidos a la fracción de aminoácidos libres. Por tanto, un método para reducir el amargor en los hidrolizados puede consistir en identificar combinaciones de enzimas que concentren específicamente la fenilalanina en la fracción de aminoácidos libres del hidrolizado total.

Ejemplo 10: Contenido medido de aminoácidos libres

25 Se midió el contenido de aminoácidos libres en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la presente invención y se comparó con un hidrolizado de proteína de suero de la leche de referencia (fuera de la invención). El resultado se muestra en la tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Contenido de aminoácidos libres (mg/100 g de proteína (Nx6,38))

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 13	Muestra 15	Muestra 16
Ácido aspártico	113,51	<10	93,24	<10	32,56	17,70
Treonina	898,44	178,05	850,42	22,72	282,30	249,70
Serina	397,09	57,51	374,84	17,34	173,36	117,33
Glutamina	222,56	31,86	181,56	<10	194,45	117,21

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 13	Muestra 15	Muestra 16
Ácido glutámico	87,62	<10	101,68	<10	42,29	29,33
Prolina	<10	<10	<10	<10	16,52	24,61
Glicina	42,05	26,59	24,48	<10	21,20	21,70
Alanina	663,0	189,76	445,12	32,68	343,21	253,33
Cistina	<10,	<10	<10	<10	<10	<10
Valina	1171,37	480,26	830,50	<10	730,94	627,88
Metionina	1055,41	473,23	1024,95	<10	500,18	386,67
Isoleucina	1311,94	524,77	981,61	44,75	763,73	665,45
Leucina	3736,68	1229,94	3127,56	152,28	2389,60	1903,03
Tirosina	317,44	42,76	274,10	30,81	102,85	78,30
Fenilalanina	<10	183,91	<10	<10	329,16	250,91
Lisina	1862,48	722,74	2237,32	81,76	742,65	723,64
Histidina	440,44	88,79	358,44	17,45	88,44	115,52
Arginina	957,01	138,22	715,71	13,47	384,21	266,67
Triptófano	339,70	16,52	361,95	<10	128,85	87,64
Asparagina	208,50	19,91	257,70	<10	121,82	59,15
Suma	13 825	4404	12 241	413,26	7266	5936

En la Tabla 7, se muestra que el contenido de aminoácidos libres en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención es del 4% al 14% en peso del contenido total de proteína. Por el contrario, el contenido de aminoácidos libres en el hidrolizado de referencia (muestra 13) es aproximadamente el 0,4% en peso del contenido total de proteínas.

Asimismo, en la Tabla 7 se muestra que el contenido de leucina libre en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención es mucho mayor que en la leucina libre de la muestra 13. El contenido de leucina libre en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención es del 1 al 4% en peso del contenido total de proteína. Por el contrario, el contenido de leucina libre en la muestra 13 es aproximadamente el 0,15% en peso del contenido total de proteínas.

Más importante aún, la concentración de fenilalanina libre, tal como se sugiere en los ejemplos 8 y 9, es mayor en las muestras 2, 15 y 16 que en las muestras 1, 3 y 13. En la Tabla 8 se muestra el porcentaje de aminoácidos libres basado en el contenido total de aminoácidos.

Tabla 8: Aminoácido libre (%) del total de aminoácidos

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 13	Muestra 15	Muestra 16
Ácido	2,00	0,19	2,47	0,00	1,48	0,76

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 13	Muestra 15	Muestra 16
aspártico/asparagina						
Treonina	12,53	2,48	11,86	0,30	3,94	3,55
Serina	8,57	1,24	8,09	0,36	3,74	2,59
Glutamina/Ácido glutámico	1,26	0,18	1,03	0,00	1,34	0,81
Prolina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,41
Glicina	2,88	1,82	1,68	0,00	1,45	1,52
Alanina	12,30	3,52	8,26	0,59	6,37	4,72
Cistina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Valina	20,18	8,27	14,31	0,00	12,59	10,93
Metionina	46,79	20,98	45,44	0,00	22,17	15,96
Isoleucina	20,16	8,06	15,08	0,70	11,73	10,25
Leucina	35,75	11,77	29,93	1,55	22,86	18,07
Tirosina	11,84	1,60	10,23	1,31	3,84	2,97
Fenilalanina	0,00	6,61	0,00	1,36	11,83	9,04
Lisina	19,80	7,68	23,79	0,82	7,90	7,77
Histidina	29,56	5,96	24,06	1,12	5,94	7,66
Arginina	47,67	6,89	35,65	0,75	19,14	14,59
Triptófano	20,39	0,99	21,73	0,00	7,73	4,76

Es especialmente notable que el porcentaje de leucina libre del contenido total de leucina en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención sea mucho mayor que en el hidrolizado de referencia (muestra 13).

- 5 Es importante destacar que en la Tabla 8 se muestra que, para los hidrolizados de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en las muestras 2, 15 y 16, entre el 6% y el 12% de la fenilalanina estaba en forma de fenilalanina libre. Para los hidrolizados de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en las muestras 1 y 3, no se encontró fenilalanina en su forma libre.

Ejemplo 11: Contenido de minerales en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención

Se midió la cantidad de minerales en las muestras 15 y 16. El resultado se muestra en la Tabla 9 a continuación.

10

Tabla 9: Contenido de minerales

Muestra	K (%)	Na (%)	Ca (%)	Citrato (%)	Ceniza (%)	Turbidez al 4% de proteína (NTU)
15	2,13	1,75	0,07	0,66	7,5	31,18

Muestra	K (%)	Na (%)	Ca (%)	Citrato (%)	Ceniza (%)	Turbidez al 4% de proteína (NTU)
16	2,45	1,6	0,09	0,65	7,2	58,68

En la Tabla 9 se muestra el contenido de minerales y la turbidez de las muestras 15 y 16 como un ejemplo del contenido de minerales de los hidrolizados de proteína de suero de la leche. Todos los productos de la Tabla 9 tienen un pH de 7,8 en una solución de proteína al 4% a 22 °C.

5 Ejemplo 12: BSA no degradada en hidrolizados

Se midió la cantidad de albúmina sérica bovina (BSA) no degradada en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención (muestras 1, 2, 3, 4, 15 y 16).

10 El contenido de BSA se estimó usando SDS-PAGE y un estándar de BSA de Sigma Aldrich con el código de producto A2153 (figura 9A). La cantidad de BSA cargada en el pocillo del 20% correspondió a 10 µg de BSA pura. La cantidad total de proteína añadida a cada pocillo del gel de SDS-PAGE mostrado en la figura 9B correspondió a 50 µg de proteína. Las muestras de proteína se mezclaron a 10 mg/ml con tampón de muestra Laemmli y 2-mercaptoetanol hasta una concentración final del 3% de proteína, seguida de incubación a 95 °C durante 5 minutos antes de cargarlas en los geles.

15 El gel SDS-PAGE de la figura 9A es una serie de valoración que muestra la intensidad esperada de la BSA si representa el 20%, el 10%, el 5%, el 2,5%, el 1,25% o el 0,63% de la cantidad total de proteína de suero de la leche de la figura 9B. El gel SDS-PAGE del estándar en diferentes concentraciones se comparó con el gel SDS-PAGE mostrado en la figura 9B con diferentes muestras de hidrolizados de proteína de suero de la leche, de izquierda a derecha: un patrón de peso molecular, muestra 2, muestra 1, muestra 3, muestra 4, muestra 15 y muestra 16.

20 De las figuras 9A y 9B se puede concluir que la BSA no degradada en los hidrolizados de proteína de suero de la leche de la invención (figura 9B) está en el intervalo del 0,5% al 2% en peso, ya que la intensidad de las bandas de la figura 9B correspondía a la intensidad de las muestras al 0,63% y al 1,25% en la figura 9A. La BSA era resistente a la proteólisis por las enzimas usadas de acuerdo con la invención.

Ejemplo 13: Bebida tratada con UHT para nutrición deportiva

25 En el ejemplo 13 se muestra un ejemplo del uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en la preparación de una bebida adecuada para su uso en nutrición deportiva. La bebida está destinada al uso de atletas o en otras aplicaciones relacionadas con el deporte o el ejercicio.

Se reconstituyó un polvo de la muestra 16 en agua y se añadieron azúcares y sabores para preparar una bebida. Las cantidades de los ingredientes se muestran en la tabla 10 a continuación.

30 En la Tabla 10 se muestra una bebida de sabor neutro sin sabor amargo desagradable que podría tratarse térmicamente mediante tratamiento UHT directo e indirecto, así como pasteurización sin desarrollar turbidez adicional.

Tabla 10: Bebida deportiva

Ingrediente	g/100 g
Polvo de la muestra 16	4,9
Sacarosa	2
Sucralosa	0,006
Sabor a piña	0,08
Sabor a lima	0,17
Agua	92,9

La bebida deportiva que se muestra en la Tabla 10 se sometió a 1) UHT directa, 2) UHT indirecta y 3) pasteurización. El tratamiento UHT directo se hizo mediante inyección a 143 °C durante 6 segundos. El tratamiento UHT indirecto se

hizo en un intercambiador de calor tubular a 143 °C durante 6 segundos. La pasteurización fue a 90 °C durante 6,5 minutos. Las bebidas se introdujeron en frascos a 5 °C. Todas las soluciones tenían un pH de aproximadamente 7,7 a 22 °C. El contenido de 4,9 g/100 g de hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención corresponde al 4,0% en peso de proteína.

- 5 En la figura 8 se muestran imágenes de izquierda a derecha de la bebida no tratada, la bebida tratada con UHT directa, la bebida tratada con UHT indirecta y la bebida pasteurizada. Las bebidas están a temperatura ambiente. En la figura 8 se muestra que todas las muestras eran claras y transparentes y se puede ver el fondo detrás de las botellas.

Se midió la turbidez nefelométrica de las 4 bebidas y el resultado se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11: Turbidez de las bebidas medida en NTU

	No tratado	UHT directo	UHT indirecto	Pasteurizado
1. muestra	58,60	52,22	73,79	39,93
2. muestra	59,22	54,41	71,76	39,88

10

Así, en la Tabla 11, se muestra que las turbideces de las muestras tratadas térmicamente estaban todas por debajo de 100 NTU. Por tanto, el tratamiento térmico no afectó a la turbidez de las bebidas que aún tenían un aspecto claro o transparente.

Estas bebidas no se percibieron como amargas.

- 15 Ejemplo 14: Bebida para uso clínico/médico

En el ejemplo 14 se muestra un ejemplo del uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en la preparación de una bebida adecuada para su uso en nutrición médica o clínica. La bebida clínica comprende una gran cantidad de hidratos de carbono, además del hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención.

- 20 Se reconstituyó un polvo de la muestra 16 en agua y se añadieron hidratos de carbono y sabores para preparar una bebida. Las cantidades de los ingredientes se muestran en la Tabla 12 a continuación.

En la Tabla 12 se muestra una bebida de sabor neutro para uso médico sin un sabor amargo desagradable.

Tabla 12: Bebida medicinal

Ingrediente	g/100 g
Polvo de la muestra 16	4,9
Hidratos de carbono	33,0
Grasa	5,0
Sacarosa	2
Sucralosa	0,006
Sabor a piña	0,08
Sabor a lima	0,17
Agua	54,8

- 25 Ejemplo 15: Bebida carbonatada

En el ejemplo 15 se muestra un ejemplo del uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la

invención en la preparación de una bebida carbonatada.

Se reconstituyó un polvo de la muestra 16 en agua y se añadieron azúcares y sabores para preparar una bebida. Las cantidades de los ingredientes se muestran en la Tabla 13 a continuación. La bebida se carbonató añadiendo dióxido de carbono a la bebida hasta que la bebida comprendió dióxido de carbono en una cantidad de 2,5 volúmenes por volumen de la bebida.

Tabla 13: Bebida carbonatada

Ingrediente	g/100 g
Polvo de la muestra 16	4,9
Sacarosa	2
Sucralosa	0,006
Sabor a piña	0,08
Sabor a lima	0,17
Agua	92,9
Dióxido de carbono (volumen por volumen de bebida)	2,5

Ejemplo 16: Carbonatación. Cómo influye la cantidad de carbonatación en el pH

La muestra 16 se resuspendió en agua para hacer una solución de proteína al 8%. La solución se carbonató a la fuerza a 5 °C.

El aumento de masa y el valor de pH de la solución se midieron a lo largo del tiempo a medida que se introducía más CO₂. Cuando la presión en equilibrio en el recipiente alcanzó aproximadamente 0,1 MPa (1 bar), no se pudo absorber más CO₂ (la presión usada bajo carbonatación forzada fue de 0,3 MPa (3 bar) a 5 °C).

En la figura 10, el pH medido se muestra en función de la cantidad de CO₂ añadida a la solución carbonatada. En la figura 10 se muestra que cuando una solución que comprende el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la muestra 16 se carbonata hasta un contenido de CO₂ de 0 a 4 volúmenes por volumen de solución, se obtiene un pH entre 5,5 y 8,25. El pH de la solución no carbonatada tiene un valor de pH de 8,25 y el valor de pH disminuyó a medida que aumentaba la cantidad de carbonatación.

En la figura 10 se muestra que la adición de CO₂ a aproximadamente 2,5 volúmenes (4,9 g/L) por volumen de solución dio como resultado una caída del pH de 8,25 a aproximadamente 6,0 a 5 °C.

En la figura 10 también se muestra que el pH alcanza un mínimo de aproximadamente 5,5 a 6,0. Por tanto, se puede concluir que la adición de CO₂ a una cantidad superior a 2,5 volúmenes por volumen de solución no disminuiría el pH a menos de aproximadamente 5,5 a 6,0.

El efecto de la carbonatación sobre el valor de pH de una solución o bebida también se analizó midiendo el pH de las siguientes disoluciones/bebidas carbonatadas hasta una cantidad de 2,5 volúmenes de CO₂ por volumen de solución/bebida:

- Una solución proteica al 4% preparada mediante resuspensión de la muestra 16 en agua
- Una solución proteica al 8% preparada mediante resuspensión de la muestra 16 en agua
- Una bebida que comprende el 8% de la muestra 16

Los resultados se muestran en la figura 11.

La bebida que comprende un 8% de la muestra 16 comprende los siguientes ingredientes:

Ingrediente	g/100 g
Polvo de la muestra 16	9,8
Sacarosa	2
Sucralosa	0,006
Sabor a piña	0,08
Sabor a lima	0,17
Agua	88
Dióxido de carbono (volumen por volumen de bebida)	2,5

En la figura 11 se muestra que la solución al 4% y al 8% de la muestra 16 y la bebida preparada a partir de la muestra 16 tienen todas un pH de aproximadamente 6,0 cuando se carbonatan hasta un contenido de CO₂ de 2,5 volúmenes de CO₂ por volumen de solución.

5 Ejemplo 17: Análisis del tratamiento térmico de una solución carbonatada

Una solución de proteína al 8% de la muestra 16 se carbonató con 2,5 volúmenes de CO₂ por volumen de solución como se explica en el ejemplo 16.

La solución se calentó a una temperatura de 95 °C en un recipiente cerrado con registro de datos. La temperatura, el pH y la turbidez se midieron en diferentes tiempos de calentamiento y el resultado se muestra en la figura 12.

- 10 Como se muestra en la figura 12, el producto carbonatado permaneció claro durante el calentamiento y después de 5 minutos a 95 °C, según lo indicado por la turbidez medida y la inspección visual. El pH permaneció en 6,2 durante el calentamiento. Estos datos indicaron que el producto carbonatado puede ser adecuado para tratamientos tales como la pasteurización y el autoclave, esencialmente tratamientos a temperaturas de hasta 120 °C durante un período prolongado, por ejemplo, 20 minutos.

15 Ejemplo 18: Barrita proteica

En el ejemplo 17 se muestran ejemplos del uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la invención en la preparación de una barrita de proteína.

En la Tabla 14 hay un ejemplo de una barrita de proteína que tiene un contenido de 5 g/100 g del hidrolizado de proteína de suero de la leche (polvo) de la presente invención.

20

Tabla 14: Barrita proteica

	g/100 g
Hidrolizado	5
Proteína de leche	37
Glicerol	4,9
Azúcares	39,5
Lípidos	6
Sabores	1,75

En la Tabla 15 se muestra otro ejemplo de una barrita de proteína, pero este ejemplo tiene un contenido de hidrolizado

de proteína de suero de la leche (polvo) en una cantidad de 13 g/100 g.

Tabla 15: Barrita proteica

	g/100 g
Hidrolizado	13
Proteína de leche	24
Glicerol	4,9
Azúcares	39,5
Lípidos	6
Sabores	1,75

Ejemplo 19: Análisis de la actividad antioxidante mediante el uso del análisis DPPH

- 5 El efecto antioxidante del hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención se analizó usando el análisis DPPH, que es un análisis de eliminación de radicales. Con el análisis se mide el efecto antioxidante mediante el uso de DPPH (hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), ya que el color del DPPH cambia de púrpura a amarillo al reaccionar con los péptidos antioxidantes.

- 10 El DPPH se disolvió en metanol a una concentración de 0,2 mM. El hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención (muestra 16) se dispersó en agua MilliQ hasta diferentes concentraciones de proteína (0%, 0,8%, 1,5%, 2,5%, 3,0%, 4,0%, 5,0% y 6,0% de proteína) y se mezcló con DPPH en volúmenes iguales (relación 1:1). Las mezclas se incubaron durante 2 horas a 22 °C para permitir que se desarrollara un color amarillo como resultado de la actividad antioxidante. Se midió la absorbancia a 525 nm y se calculó el porcentaje de eliminación como $100 \times (A_0 - A_s) / A_0$, donde A_0 es la absorción en ausencia de muestra y A_s es la absorbancia en presencia de la muestra.

- 15 En la Tabla 16 se muestra el porcentaje de eliminación para diversas concentraciones del hidrolizado de proteína de suero de la leche de la invención (muestra 16).

Tabla 16:

Muestra 16 (% de proteína)	Porcentaje de eliminación (%)
0	0
0,8	48 ± 2
1,5	57 ± 3
2,5	67 ± 1
3	72 ± 1
4	75 ± 2
5	77 ± 2
6	78 ± 0

- 20 En la Tabla 16, se muestra que el hidrolizado de proteína de suero de la leche de la muestra 16 tiene una actividad antioxidante cuando se incluye en el análisis DPPH a concentraciones del 0,8% al 6% de proteína. Como se muestra en la Tabla 16, la actividad antioxidante aumentó a medida que aumentaba la concentración de proteína.

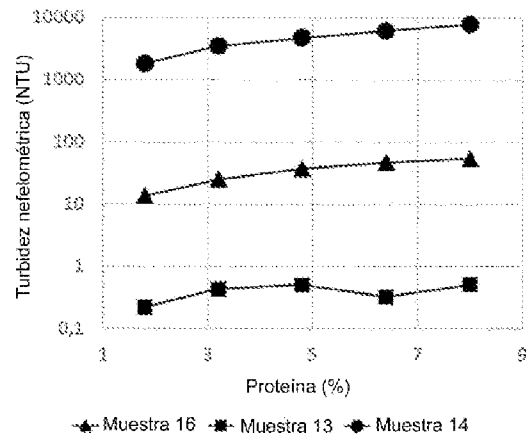
REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un hidrolizado de proteína de suero de la leche que comprende:
 - a) proporcionar una solución de proteína de suero de la leche que comprende proteína de suero de la leche en una cantidad de al menos el 50% en peso basada en el contenido de sólido total;
 - 5 b) someter la solución de proteína de suero de la leche a hidrólisis enzimática, en donde la hidrólisis enzimática se realiza con el uso de una de las siguientes combinaciones de enzimas:
 - i) que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una proteasa similar a la tripsina
 - 10 ii) que comprende al menos una serina endopeptidasa de *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*
 - iii) que comprende al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos bromelaína y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus*
 - c) detener la hidrólisis enzimática mediante la inactivación de las enzimas cuando el grado de hidrólisis (GH) sea del 20% o más para obtener un hidrolizado de proteína de suero de la leche; en donde el método no comprende ninguna etapa de ultrafiltración del hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido en la etapa c).
 - 15
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método comprende asimismo una etapa d) de concentrar y/o secar el hidrolizado de proteína de suero de la leche obtenido en la etapa c).
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la solución de proteína de suero de la leche de la etapa a) comprende lípidos en una cantidad de como máximo el 10% en peso basado en el contenido total de sólidos.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la hidrólisis enzimática en la etapa b) se realiza a una temperatura en el intervalo de 40 °C a 75 °C.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la solución de proteína de suero de la leche comprende proteína en una cantidad del 2% en peso o más de la solución de proteína de suero de la leche.
- 25 6. El método de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 1 a 5, en donde la hidrólisis enzimática en la etapa c) se detiene inactivando las enzimas cuando el grado de hidrólisis (GH) está en el intervalo del 20% al 35%.
7. El método de acuerdo con cualquiera las reivindicaciones 1 a 6, en donde la hidrólisis enzimática en la etapa b) se realiza con el uso de una de las siguientes combinaciones de enzimas:
 - i. que comprenden al menos una serina endopeptidasa de la especie *Bacillus*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una proteasa similar a la tripsina de origen microbiano,
 - 30 ii. que comprenden al menos una subtilisina de *Bacillus licheniformis*, al menos una serina endopeptidasa de *Aspergillus oryzae* y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*,
 - iii. que comprenden al menos una bacilolisina de *Bacillus amyloliquefaciens*, al menos bromelaína de *Ananas comosus*, y al menos una leucilaminopeptidasa de *Aspergillus oryzae*.
8. Un hidrolizado de proteína de suero de la leche que comprende:
 - 35 - aminoácidos y péptidos libres, y
 - que tiene un grado de hidrólisis de al menos el 20%
 - péptidos que tienen un peso molecular de 2500 Da o más en una cantidad del 8% al 25% en peso de la cantidad total de péptidos, y
 - 40 - que tiene aminoácidos libres en una cantidad del 15% en peso o menos del contenido total de aminoácidos en el hidrolizado, y

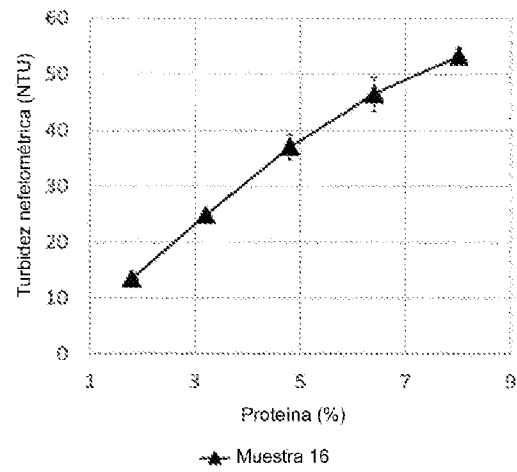
en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche en una solución de proteína al 4% p/p tiene una puntuación de amargor correspondiente a una solución de cafeína del 0,08% p/v o menos.
9. Un hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el grado de hidrólisis es del 20% al 35%.
- 45 10. El hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene una turbidez nefelométrica (NTU) de 100 o inferior en una solución

de proteína al 4% (p/p).

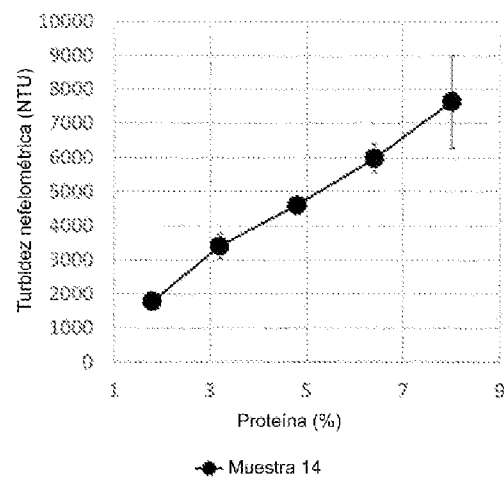
11. El hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche comprende aminoácidos libres en una cantidad del 2% al 15% en peso del contenido total de proteína en el hidrolizado.
- 5 12. El hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene una actividad antioxidante.
13. El hidrolizado de proteína de suero de la leche según las reivindicaciones 8 a 12, en donde se mide que la actividad antioxidante del hidrolizado de proteína de suero de la leche tiene un porcentaje de eliminación del 54% al 60% en peso en una solución de proteína al 1,5% en peso.
- 10 14. Uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 en un producto alimenticio.
15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el hidrolizado de proteína de suero de la leche se usa en el producto alimenticio en una cantidad correspondiente a que el producto alimenticio comprenda del 2% al 25% en peso de proteína hidrolizada.
- 15 16. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, en donde el producto alimenticio se selecciona del grupo que consiste en un producto lácteo, una bebida, un batido, un gel, una inyección y una barrita alimenticia.
17. Uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 como ingrediente alimentario.
- 20 18. Uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 como ingrediente alimentario en la preparación de una bebida estable a UHT con un pH de 6,5 a 8,0.
19. Uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 como ingrediente alimentario en la preparación de bebidas para su uso como nutrición deportiva.
20. Uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 como ingrediente alimentario en la preparación de una bebida clínica.
- 25 21. Uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 como ingrediente en la preparación de una bebida carbonatada.
22. Uso del hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 como antioxidante.
- 30 23. Una bebida carbonatada que comprende hidrolizado de proteína de suero de la leche de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.



(A)



(B)

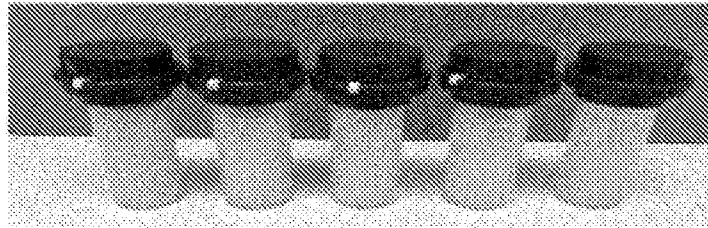


(C)

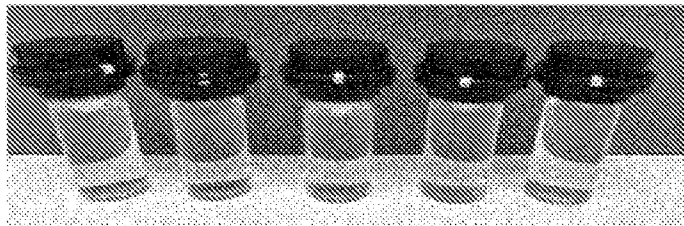
Fig. 1



(A)



(B)



(C)

Fig. 2

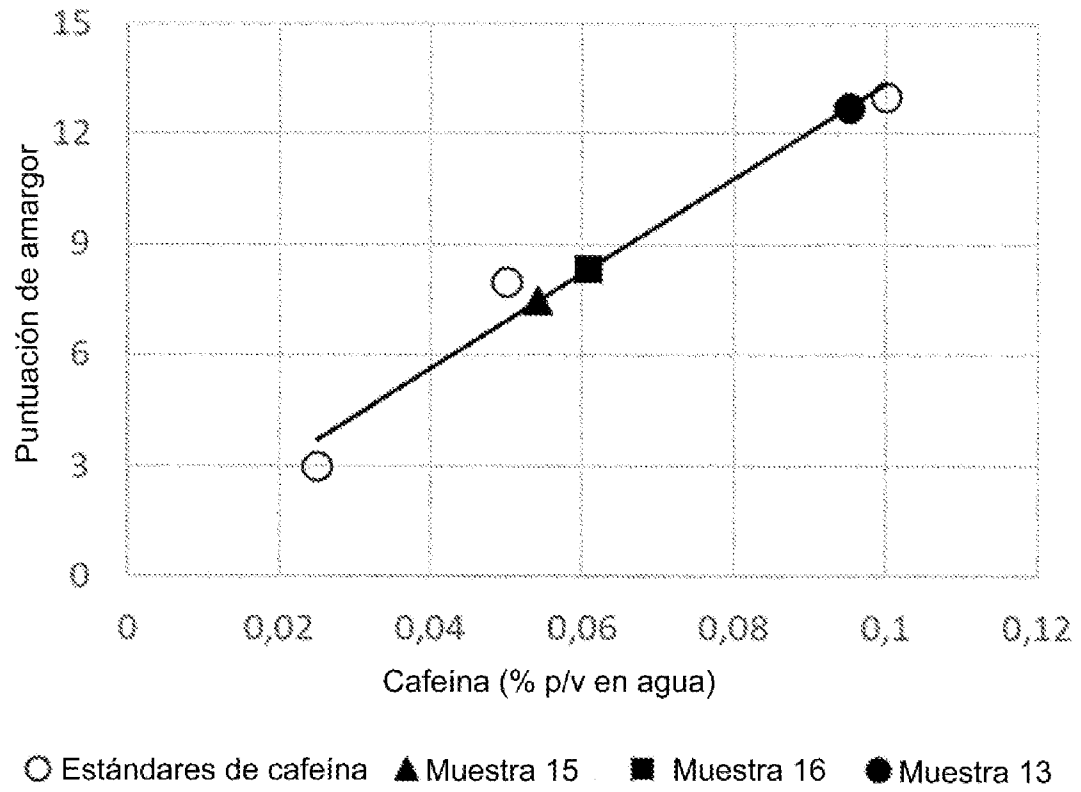


Fig. 3

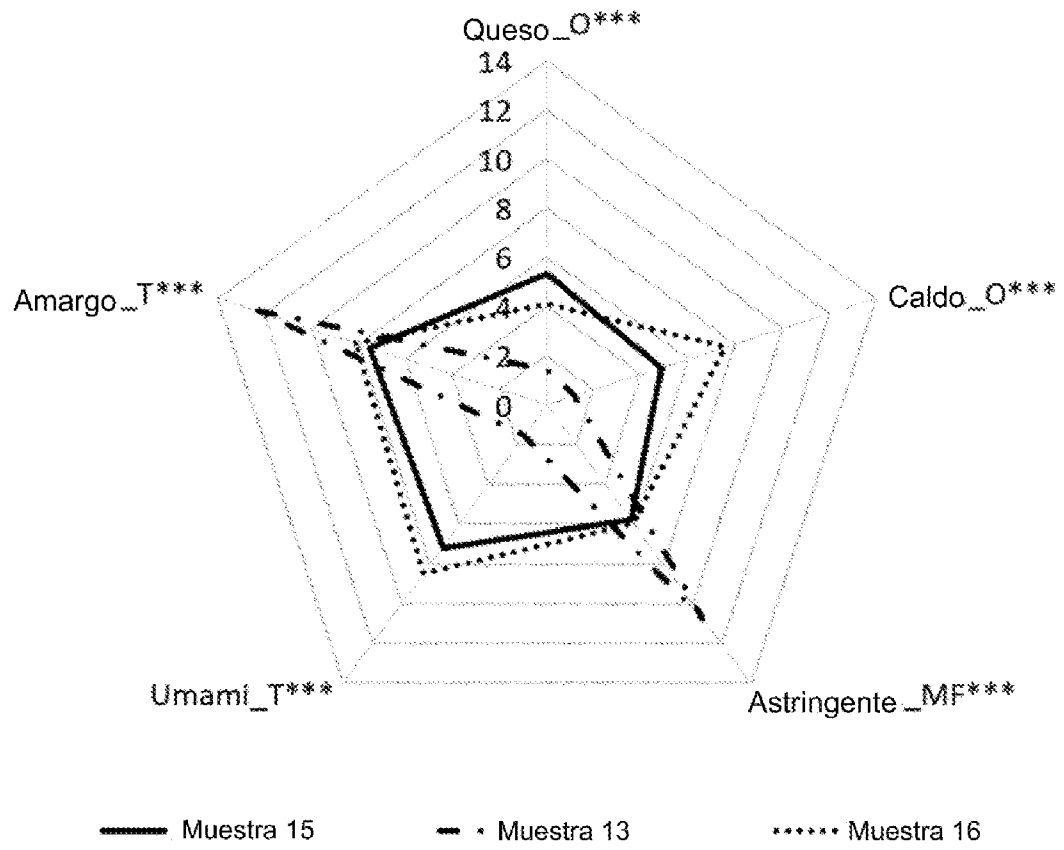


Fig. 4

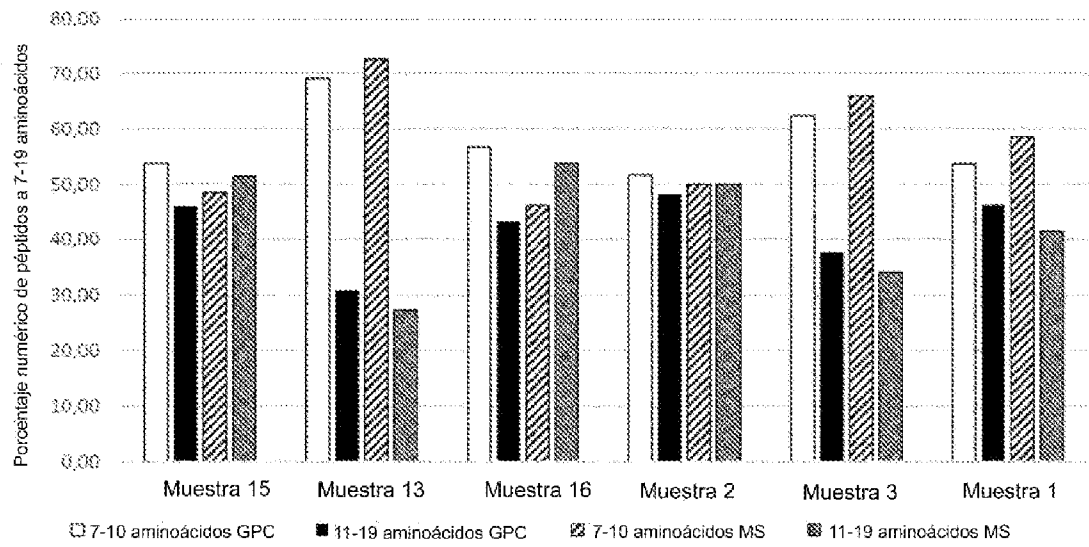


Fig. 5

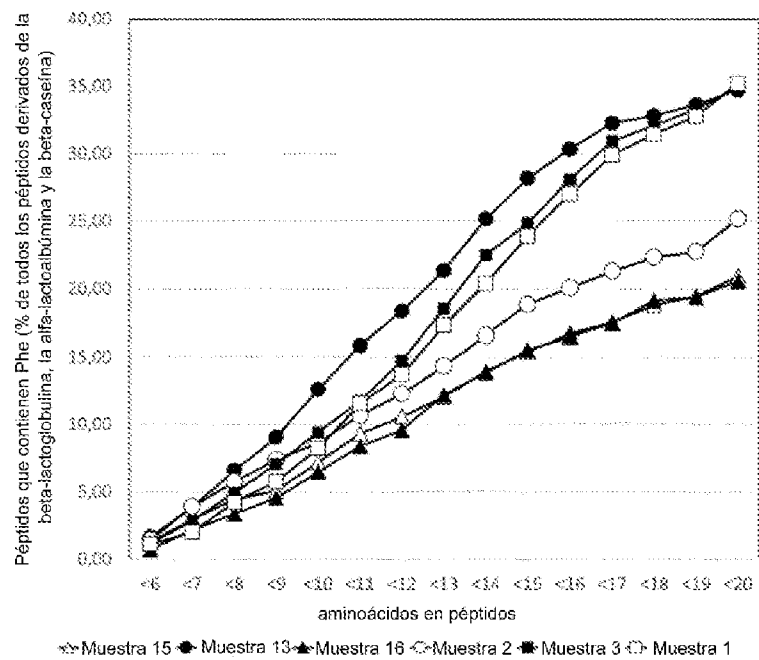


Fig. 6

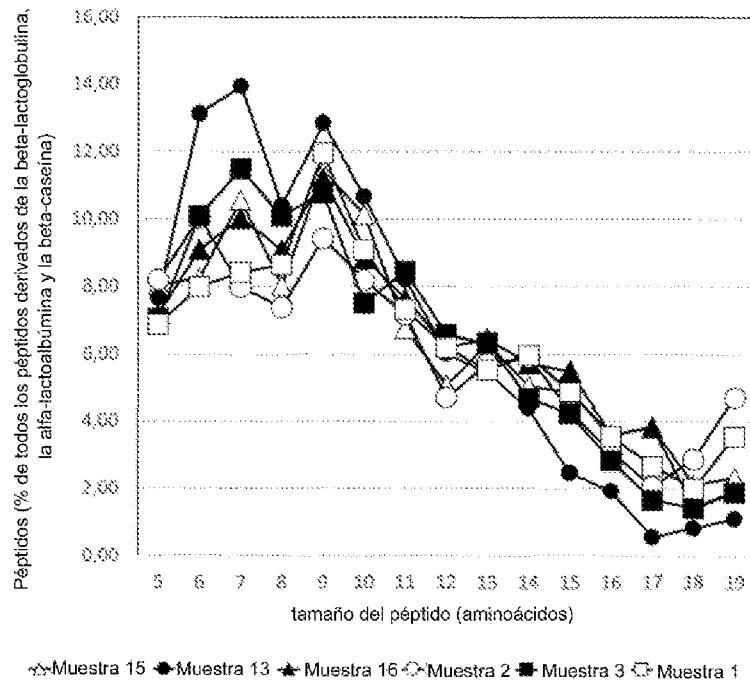


Fig. 7

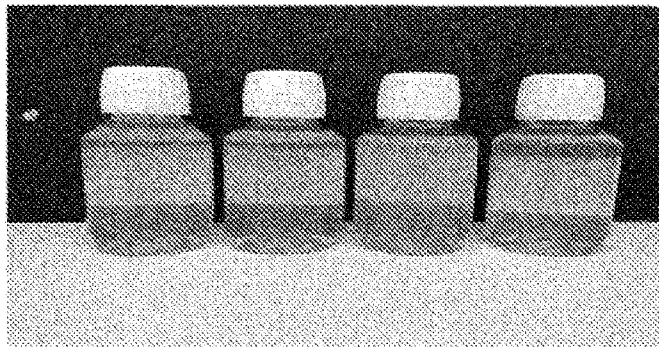


Fig. 8

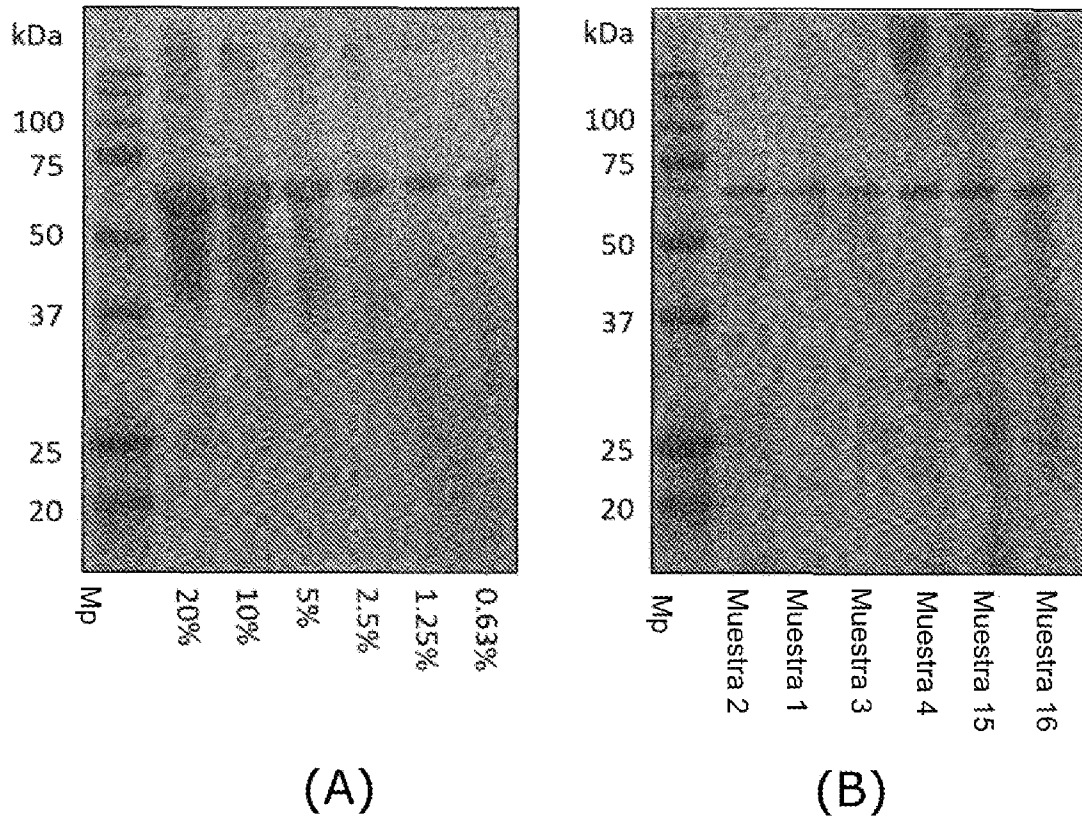


Fig. 9

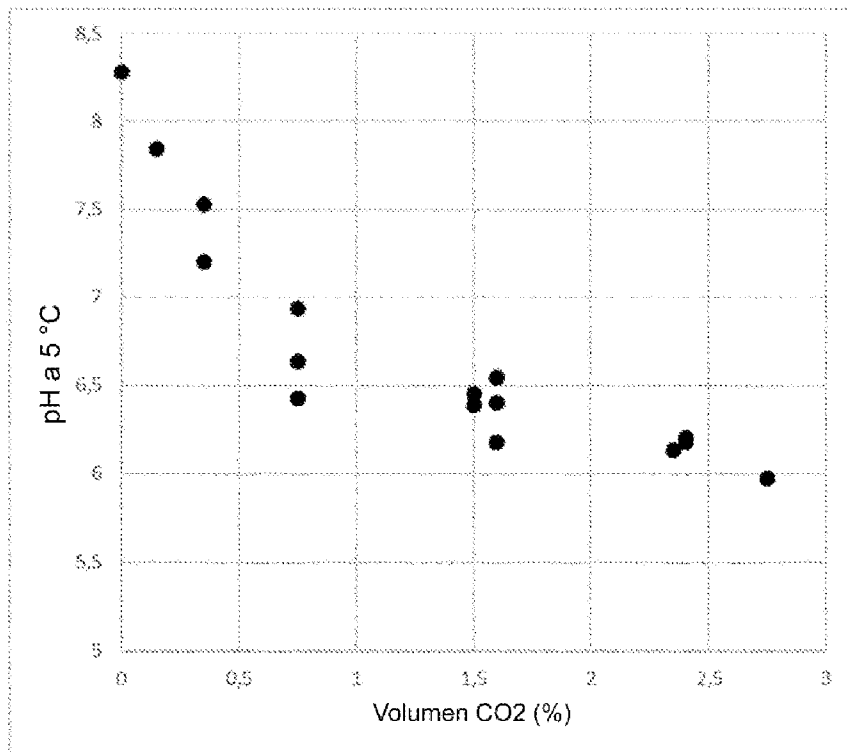


Fig. 10

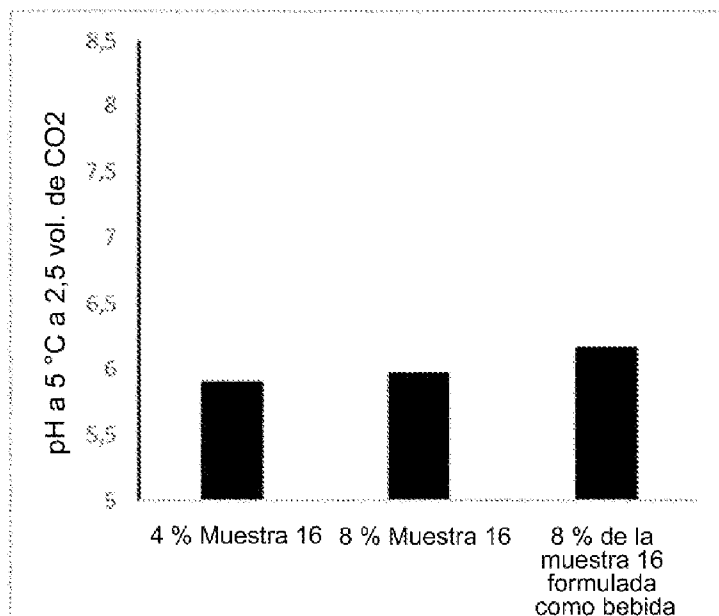


Fig. 11

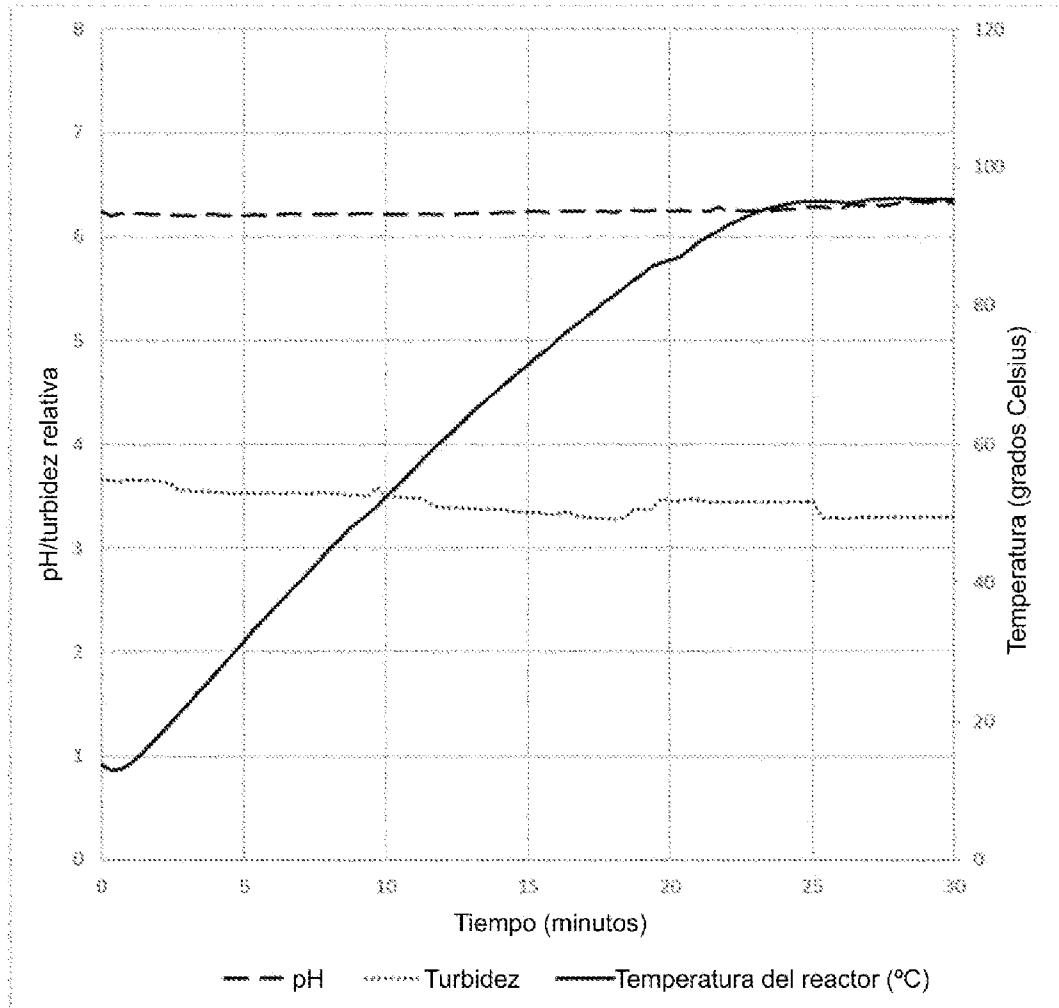


Fig. 12