



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 185 075** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 23 J 3/34//A 23 J 3/16, 3/18**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 96109825/13, 24.05.1996
(24) Дата начала действия патента: 24.05.1996
(30) Приоритет: 25.05.1995 US 08/450421
(43) Дата публикации заявки: 10.05.1999
(46) Дата публикации: 20.07.2002
(56) Ссылки: US 5039532, 13.08.1991. SU 1554173, 27.02.1996. EP 0061946, 06.10.1982. US 5141757, 25.08.1992. EP 0087247, 31.08.1983.
(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат. пов. Е.В.Томской, рег. № 0106

(71) Заявитель:
СОСЬЕТЕ ДЕ ПРОДЮИ НЕСТЛЕ С.А. (CH)
(72) Изобретатель: МАККАРТИ Джеймс (US),
ВАДЕХРА Дхарам Вир (IN)
(73) Патентообладатель:
СОСЬЕТЕ ДЕ ПРОДЮИ НЕСТЛЕ С.А. (CH)
(74) Патентный поверенный:
Томская Елена Владимировна

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СЪЕДОБНОГО ГИДРОЛИЗАТА (ВАРИАНТЫ)

(57)
Изобретение относится к ферментативному гидролизу веществ, в частности белковых, и более конкретно - к способу получения съедобного гидролизата. Способ включает гидролиз белкового вещества растительного происхождения протеолитическим ферментным препаратом для получения гидролизного субстрата, нагревание полученного гидролизного субстрата при температуре и в течение времени, достаточных для получения субстрата, лишённого мезофильных

микроорганизмов и спор. Гидролиз гидролизного субстрата, лишённого мезофильных микроорганизмов и спор, проводят в стерильной системе стерильным ферментным препаратом. Изобретение позволяет получить ферментативные гидролизаты низкого молекулярного веса и/или с узким профилем белков, а также обеспечить высокий выход получаемой продукции при одновременном снижении потребления количества белков. 2 с. и 12 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2 185 075 C2

RU 2 185 075 C2



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 185 075** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 23 J 3/34//A 23 J 3/16, 3/18**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 96109825/13, 24.05.1996
(24) Effective date for property rights: 24.05.1996
(30) Priority: 25.05.1995 US 08/450421
(43) Application published: 10.05.1999
(46) Date of publication: 20.07.2002
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat. pov. E.V.Tomskoj, reg. № 0106

(71) Applicant:
SOS'ETE DE PRODUIT NESTLE S.A. (CH)
(72) Inventor: MAKKARTI Dzhejms (US),
VADEKkhRA Dkharam Vir (IN)
(73) Proprietor:
SOS'ETE DE PRODUIT NESTLE S.A. (CH)
(74) Representative:
Tomskaja Elena Vladimirovna

(54) **METHOD OF PRODUCING POTABLE HYDROLYSATE (VERSIONS)**

(57) Abstract:
FIELD: fermentative hydrolysis of substances, particularly, protein substances. SUBSTANCE: method includes hydrolysis of a protein substance of vegetable origin by a proteolytic ferment preparation for producing hydrolytic substrate. Prepared hydrolytic substrate is heated at temperature and during the time sufficient for producing a substrate without

mesophyll microorganisms and spores. Hydrolysis of the hydrolytic substrate without mesophyll microorganisms and spores is conducted in a sterilized system by sterilized ferment preparation. The invention allows to produce fermentative hydrolysates with low molecular weight and/or proteins. EFFECT: higher output of production; reduced consumption of proteins. 14 cl, 1 tbl, 6 ex

RU 2 185 075 C2

RU 2 185 075 C2

Изобретение относится к ферментативному гидролизу веществ, в частности белковых, и более конкретно - к способу получения съедобного гидролизата.

В течение последних двадцати пяти лет в промышленности значительно увеличился интерес к использованию ферментов для гидролиза веществ, особенно в пищевой промышленности, поскольку при кислотном гидролизе, который пока используют, некоторые важные аминокислоты полностью разлагаются, а остальные разлагаются частично. Кроме того, в настоящее время признано, что во время гидролиза белков соляной кислотой образуются побочные продукты, известные как хлоргидрины, то есть хлорпропанол и диоловые соединения, которые могут вызывать проблемы со здоровьем.

Ферментативный гидролиз веществ происходит посредством расщепления химических связей в веществе. Как правило, приготовление гидролизатов, которые предполагают использовать сами по себе как пригодный к потреблению съедобный продукт, такой как продукт для целей питания или для других применений, например, в качестве ароматизаторов, или для получения других продуктов, или для использования при получении части конкретного продукта или его частей для таких или иных применений, осуществляют, например, путем введения ферментного препарата с водной суспензией вещества в условиях, когда для эффективности процесса вещество является по меньшей мере частично солюбилизованным. Выбор ферментного препарата и других реагентов основан на композиционной химической структуре вещества (веществ), которые надо гидролизовать, и на требуемой характеристике продукта-гидролизата.

Известно применение стерильных ферментных препаратов лактазы в пастеризованном или стерилизованном молоке и молочных продуктах с целью разрушения лактозы так, как сообщается в Vijl, канадский патент 1246476, и предлагают, что стерильные ферментные препараты используют в фармацевтической промышленности. Однако в общем случае гидролизующих ферментов, в частности при промышленной практике получения питательных и ароматичных съедобных продуктов, обычно не считают проблемой микробиологическое загрязнение, поскольку процедуры гидролиза, как правило, проводят при температуре в диапазоне от 50 до 60°C в течение от примерно 8 часов до примерно 12 часов, так что рост бактерий ограничен, как отмечают Erikson и др. в публикации патентной заявки PCT WO 92/11771. Более того, хотя сообщается, что ферментативный гидролиз белков можно осуществлять при температуре ниже 50°C, как правило, даже в таких случаях микробиологическое загрязнение обычно может не вызывать беспокойства, так как продукты-гидролизаты белков после получения нагревают до температуры и в течение времени по меньшей мере достаточных для того, чтобы инактивировать ферменты, и применение температуры и времени для проведения пастеризации или стерилизации продукта является обычным явлением.

С другой стороны, отмечено, что в препарате соевого соуса, изготовленного век назад из коджи, удалось избежать микробиологического загрязнения при высокой концентрации хлорида натрия, однако теперь полагают, что это не обязательно требуется из соображений здоровья и, более того, не способствует активности многих ферментов. Использовали также другие агенты для подавления роста микроорганизмов, такие как предложенные Kemmerer, патент США 2180637 и использованные Kikuchi и др., патент США 3857967, однако описанные агенты не желательны для пищевых применений.

По сравнению с известными процессами ферментации микроорганизмами или процедурами кислотного гидролиза, которые имеют ограниченную способность доведения конечных продуктов, так как обычно легко контролировать можно только меру или степень гидролиза, ферментативный гидролиз теоретически позволяет из любого конкретного обрабатываемого субстрата получить множество продуктов, очень точно доведены до конкретных характеристик. Однако, как документировано на уровне техники, обычно особенно в рамках анализа отношения затраты/прибыль, полагают, что даже если это может быть так, выходы требуемых продуктов, полученных ферментативным гидролизом белков, хотя и зависят от количества используемого фермента, но являются низкими, и обычно является правилом, а не исключением, что такие методики приводят к существенным количествам побочного продукта (продуктов), которые имеют относительно мало применений и не имеют большой экономической ценности.

Фактор, влияющий на выход требуемого продукта (продуктов), заключается в том, что полученные для общего промышленного применения ферментные препараты, которые известны на уровне техники как ферменты товарного сорта, обычно являются смесью или "коктейлем" многих ферментов, отличающихся по сродству к субстрату и специфичности, далее называемыми "активностью", то есть способностью осуществлять расщепление химической связи в конкретном субстрате при определенной совокупности условий реакции, включающих pH и температуру. Хотя преобладает активность одного из ферментов коктейля-препарата, и хотя известны ситуации, когда можно последовательно добиться двух желаемых активностей ферментного препарата, например, путем регулирования pH, как описано в Giappa и др., публикация европейской патентной заявки 0320717, остальной фермент (ферменты) препарата, которые можно рассматривать как "примеси", способны привести к результатам и эффектам, которые могут конкурировать с требуемыми эффектами и результатами или даже мешать им. Например, в зависимости от субстрата и/или условий гидролиза "примеси" могут уменьшить выход от теоретического, поскольку они могут вызывать конкурирующие реакции и/или даже могут быть разрушительными в отношении фермента с преобладающей активностью, вызывая таким образом ингибирование реакции более

значительное, чем ожидаемое на основе теоретического рассмотрения.

Для того чтобы усилить контроль над процессом и увеличить специфичность конечного продукта, было бы желателен использовать по существу чистые ферменты. Однако существенно повышенная цена ферментного препарата из-за процедур очистки обычно приводит к отношению затраты/прибыль, которое, как правило, не может быть оправдано при общем промышленном применении, кроме применения в фармацевтической промышленности, или для относительно маломасштабных дорогих аналитических целей, или в биоинженерии. Это особенно справедливо для пищевых ароматизаторов, особенно когда отношение затраты/прибыль для очищенного фермента сравнимо с отношением при проведении обычных ферментаций микроорганизмами или кислотного гидролиза.

Что касается вышеупомянутых проблем, то в практике промышленности, в особенности в области съедобных продуктов, то есть пищи, принято использовать большие количества препаратов товарного сорта для того, чтобы усилить активность преобладающего фермента в данном препарате в сравнении с той, которая теоретически потребуется для любой данной совокупности рабочих условий, а также принято осуществлять реакцию от примерно 8 часов до примерно 12 часов. Например, применение большего количества ферментного препарата ускоряет реакцию для любой данной совокупности условий и, как правило, при работе таким образом не наталкиваются на трудности, если белковые вещества подвергают умеренной степени гидролиза, получая гидролизат, который имеет широкий профиль белков и состоит из компонентов с молекулярным весом более 10,000 Дальтон.

Однако, возникают различные проблемы, когда требуется получить белковый гидролизат, такой как гидролизат, пригодный для пищевых применений, который характеризуется высокой степенью гидролиза, так что продукт содержит значительное количество свободных аминокислот и/или узкий профиль диапазона размера белков, например молекулярный вес, ниже примерно 10,000 Дальтон и, предпочтительно, ниже примерно 6,000 Дальтон. Как обсуждается, такие продукты пригодны для широкого разнообразия пищевых и питательных применений, включая рецептуры для детей с аллергией к белкам молока. Однако, если не используют особые комбинации реагентов и условий, такие как в Jost, патент США 5039532, как указано выше, обычно полагают, что выходы таких продуктов нежелательно низки, и, как правило, такие методики считаются дорогими вследствие применяемого ферментного препарата (препаратов). С другой стороны, используемый субстрат может быть разбавлен с целью уменьшения потребления фермента, что также делает экономику процесса непривлекательной по соображениям соотношения единица/объем.

Также известно, что для получения высокоценных продуктов конечного применения ферментативные методики

комбинируют с такими методиками выделения гидролизата, как ультрафильтрация. Эти методики включают те, которые описаны, например, в Erikson и др., публикация патентной заявки PCT WO 92/11771 и в Nielsen и др., публикация патентной заявки PCT WO 93/24020; кроме того, альтернатива методикам отдельного выделения была предложена в Maubois и др., патент США 4427658, где описано применение ультрафильтрационного мембранного реактора, который можно использовать в непрерывном режиме с целью рециклирования и дальнейшей переработки проникшего вещества. Однако Maubois указывает, что отношение концентрации фермента к концентрации белка должно быть порядка 8-15%.

Таким образом, в пищевой промышленности, особенно в связи с гидролизом белков, давно и по сей день есть желание надежно получать ферментативные гидролизаты низкого молекулярного веса и/или с узким профилем белков, а также стремление повысить выход при одновременном снижении потребления количества белков с целью достижения экономии в затратах и эффективности соотношения затраты/прибыль.

В настоящем изобретении предлагается способ ферментативного гидролиза веществ, подверженных ферментативному гидролизу, в частности белковых веществ, который позволяет использовать ферментные препараты при температуре, позволяющей оптимизацию или иное регулирование ферментной активности с целью достижения высоких степеней гидролиза и усиленного контроля над профилем продуктов, причем без применения атимикробных средств. Замечательным является то, что в особенности в случае гидролиза белков настоящее изобретение позволяет не только получить вышеуказанные преимущества, но также достичь выходов продуктов ферментативного гидролиза с низким молекулярным весом, которые по меньшей мере сравнимы с выходами предыдущих методик, даже хотя используется меньшее количество ферментного препарата, чем обычно используемое ранее в прототипных способах ферментативного гидролиза. Посредством этого настоящее изобретение обеспечивает снижение затрат по сравнению с прототипными ферментативными способами, поскольку использование фермента является главной проблемой, связанной с затратами при производстве, когда практически осуществляют ферментативный гидролиз.

Кроме того, в соответствии со способом по данному изобретению, можно манипулировать температурными условиями переработки для того, чтобы повысить активность ферментного препарата и/или подавить или повысить активность ферментных "примесей" в препарате. Более того, способ по настоящему изобретению позволит использовать ферменты для производства гидролизатов пищевого применения, которые до этого обычно не рассматривали как благоприятные для промышленного применения из-за их температурного профиля активности.

Последующие результаты были получены

по способу, отличающемуся тем, что субстрат, подверженный ферментативному гидролизу и свободный от жизнеспособных мезофильных микроорганизмов и спор, в частности белковый субстрат, гидролизуют в стерильной системе стерильным ферментным препаратом, пригодным для гидролиза субстрата, то есть расщепления субстрата.

Гидролиз можно осуществлять при любой температуре, включая мезофильный диапазон, то есть от примерно 20°C до примерно 40°C, а также при температурах ниже мезофильного диапазона, с условием, что температура такова, что фермент(ы) является/являются активными. Для того чтобы достичь дополнительных преимуществ длительного гидролиза, которые стали доступными благодаря настоящему изобретению, выгодно проводить гидролиз при температуре ниже мезофильного диапазона, предпочтительно в психрофильном диапазоне, то есть от примерно 0°C до примерно 20°C, а более выгодно - при температуре ниже 17°C. Однако среда субстрата не должна быть нежидкой, например замороженной, и, таким образом, гидролиз можно выгодно проводить при температуре от примерно 0°C до примерно 45°C, хотя не исключаются более высокие температуры.

В контексте данного описания и формулы изобретения предполагается, что термин "белковый субстрат" означает и включает интактные белки, то есть белки как таковые, а также пептиды.

В контексте данного описания и формулы изобретения предполагается, что термин "ферментный препарат" означает и включает по меньшей мере один фермент в стабильной форме, такой как в форме дегидратированного порошка, или в растворе или суспензии в жидкости, как правило в водной среде, а также предполагается, что этот термин включает очищенные ферменты и ферменты товарного сорта, известные на уровне техники.

В контексте данного описания и формулы изобретения предполагается, что термин "стерильный" ферментный препарат означает и включает то, что ферментный препарат не содержит жизнеспособных микроорганизмов и их спор, то есть грибков, дрожжей и бактерий, чего можно добиться путем известных и обычных методов стерильной фильтрации. Полагается, что стерильным ферментным препаратом является тот, который не содержит микроорганизмов или спор, способных проходить через мембрану, то есть фильтр, с размерами пор 0,45 мкм.

Кроме того, в тех случаях, когда микроорганизмы и/или споры присутствуют в ферментном препарате, но не являются жизнеспособными, предполагается, что термин "стерильный" означает, что препарат был подвергнут процедуре, включающей, но не ограниченной нижеописанными процедурами, для того, чтобы сделать микроорганизмы и связанные с ними споры неспособными жить, развиваться, воспроизводиться и/или регенерироваться и так, чтобы какой-либо рост микроорганизмов, который возникает при получении продукта и которого стараются избежать, не превышал бы роста в случае вышеописанного

препарата, профильтрованного в стерильных условиях.

В контексте данного описания и формулы изобретения предполагается, что термин "стерилизованная система" означает и включает оборудование, подходящее для осуществления ферментативного гидролиза, включающее описанные ниже устройства и системы устройств, но не ограниченное ими, которое обработали такими методами, как тепло, УФ или ионизирующее излучение, и/или промывка спиртом, либо иными подобными методами стерилизации, известными на уровне техники, которые подходят для достижения асептического состояния оборудования. Конечно, стерильное состояние элементов системы должно поддерживаться перед использованием ее для проведения процесса по настоящему изобретению в как можно большей степени при использовании известных и принятых асептических методов и процедур для избежания загрязнения.

Хотя по настоящему изобретению можно обрабатывать любые известные ферментативно гидролизующие вещества, преимущественно обрабатывают белковые вещества для получения съедобных продуктов. Как будет дополнительно проиллюстрировано далее, данное изобретение особенно выгодно применять для обработки растительных белковых веществ, и его особенно выгодно применять для обработки клейковины пшеницы, которая предполагается здесь как включающая нативную клейковину, а также белка сои, белка кукурузы и произведенных из них пептидов. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения общей чертой обработки таких белковых веществ является конечная стадия гидролиза или стадия, осуществляемая как описано выше, в которой используют стерильный ферментный препарат, подходящий для расщепления пептида, причем ферментный препарат выбирают в зависимости от требуемой характеристики конечного продукта. Например, для получения продукта, содержащего большие количества свободных аминокислот, особо можно использовать экзопептидазу, то есть аминокептидазу или карбоксипептидазу, а для достижения высоких выходов таких продуктов, как глутаминовая кислота или глутамиловый пептид, используют глутамазу.

Таким образом, предпочтительные варианты настоящего изобретения для гидролиза белковых веществ особенно выгодно осуществлять через несколько стадий и в качестве конечной стадии наиболее выгодно использовать вышеописанное изобретение. Как правило, в таких случаях гидролизат, полученный протеолитическим гидролизом суспензии белкового вещества, обрабатывают так, что делают нежизнеспособными содержащиеся в гидролизате мезофильные микроорганизмы и споры, и придание микроорганизмам и спорам нежизнеспособности эффективно осуществляется путем нагревания гидролизата при температуре и в течение времени, которые достаточны для освобождения гидролизата от жизнеспособных микроорганизмов и спор. Затем нагретый гидролизат охлаждают так,

что он сохраняет свою стерильность, и после этого охлажденный субстрат гидролизуют в стерильной системе стерильным ферментным препаратом, как описано выше.

Как указано выше, при обработке белковых материалов преимущества настоящего изобретения достигаются путем осуществления одной или нескольких стадий или ступеней ферментативного гидролиза. В соответствии с настоящим изобретением, при осуществлении нескольких стадий одну или несколько ступеней можно провести по вышеописанной методике гидролиза в стерильных условиях. Однако, как было указано, обычно будет обнаружено, что наиболее выгодно осуществлять гидролиз по методике гидролиза в стерильных условиях в соответствии с изобретением в качестве конечной или последней ступени из множества ступеней гидролиза.

Например, специалистам будет понятно, что для того, чтобы ферментативный гидролиз, начиная с интактных белков, протекал эффективно, выгодно, чтобы вначале белковое вещество было частично солюбилизовано, что способствует образованию суспензии вещества в водной среде. Также будет понятно, что в зависимости от состава вещества, образующего субстрат реакции, частичную солюбилизацию белкового вещества можно осуществить одним только выбором условий по pH. Например, кукуруза, белки кукурузы и сходные по составу вещества будут достаточно солюбилизоваться с целью облегчения гидролиза при pH от примерно 0 до примерно 9. С другой стороны, по меньшей мере частичную солюбилизацию можно осуществить по процедуре протеолиза при особом значении pH, и будет обнаружено, что клейковина пшеницы и подобные по составу вещества будут лучше солюбилизоваться при такой процедуре.

Таким образом, настоящее изобретение включает способы, в которых перед процедурой гидролиза в стерильных условиях белковое соединение гидролизуют протеолитическим ферментным препаратом с целью получения субстрата для обработки в процедуре в стерильных условиях. Кроме того, перед проведением процедуры в стерильных условиях белковое вещество можно обработать протеолитическим ферментным препаратом для того, чтобы солюбилизовать белок вещества с целью получения по меньшей мере частично солюбилизованного субстрата, а затем солюбилизованный субстрат обрабатывают протеолитическим ферментным препаратом с целью получения белкового субстрата для обработки по процедуре в стерильных условиях, и данные обработки можно осуществлять таким образом, что субстрат лишают жизнеспособных микроорганизмов и спор, причем здесь определено, что такая обработка включает для достижения этих целей термообработку, как дополнительно обсуждается ниже.

Кроме того, может быть желательно предварительно обработать субстрат в соответствии с методиками, такими как изложенными в вышеуказанных заявках РСТ, или в соответствии с методиками, описанными в Melachouris и др., публикация европейской патентной заявки 0087247. В

любом случае, когда настоящее изобретение используют в качестве конечной стадии гидролиза, субстрат, то есть гидролизат, который нужно гидролизовать, обрабатывают так, что мезофильные микроорганизмы и споры в субстрате делают нежизнеспособными, а затем субстрат гидролизуют ферментным препаратом, как описано выше.

В частности, можно обнаружить, что перед гидролизом по изобретению и/или перед, и/или между стадиями многоступенчатой процедуры выгодно нагревать белковый субстрат для того, чтобы денатурировать белок, что таким образом разворачивает структуру белка/пептида и делает вещество более подверженным атаке ферментом и расщеплению. Подобным образом можно изменить условия по pH между стадиями для того, чтобы согласовать характер используемого препарата различных ферментов с последующей стадией и/или природой субстрата. Как будет понятно, воздействие тепла для того, чтобы сделать субстрат свободным от жизнеспособных микроорганизмов и спор, так, как будет дополнительно обсуждаться ниже, также вызовет денатурацию.

Ферментные препараты, используемые в соответствии с настоящим изобретением, можно сделать по существу стерильными путем удаления из препарата микроорганизмов и спор или путем воздействия на ферменты процедурами, которые делают микроорганизмы и споры нежизнеспособными, но не влияют на жизнеспособность и активность ферментного препарата. Предпочтительным средством получения стерильных ферментов является стерильное фильтрование раствора ферментного препарата, а в дополнение к мембранным фильтрам, известным на уровне техники, пригодными системами для этого являются шприцевые фильтры UNIFLO, которые можно получить от Schleicher and Schuell, Inc., Keene, New Hampshire, США. Также годится тангенциальная фильтровальная система PROFLUX M12, которую можно получить от Amicon, Inc., Беверли, Массачусеттс, США.

Как было указано выше, полагается, что стерильным ферментным препаратом является препарат, не содержащий жизнеспособных микроорганизмов или спор, которые не будут проходить через фильтр с порами 0,45 мкм. Однако можно использовать фильтрацию через более мелкие поры, и это может быть предпочтительно как перестраховка для того, чтобы исключить микроорганизмы и споры, способные проходить через мембрану, то есть фильтр с порами 0,22 микрометра.

Кроме того, стерильный ферментный препарат можно получить путем облучения ферментного препарата, например ионизирующим излучением, как описано в патенте Германской Демократической Республики DD 237 078 A3, или его можно получить методами осаждения уксусом или спиртом, которые известны на уровне техники. С другой стороны, если доступен стерильный ферментный препарат, например, в виде порошка, и если желательно разбавить препарат водой, необходимо использовать стерильную воду.

Во всех случаях, после того, как был получен стерильный ферментный препарат, при применении по настоящему изобретению с ним нужно обращаться в соответствии с хорошей практикой работы в стерильных/асептических условиях.

Что касается обеспечения того, чтобы субстрат был гидролизован в соответствии с настоящим изобретением в отсутствие жизнеспособных мезофильных микроорганизмов и спор, то было обнаружено, что при осуществлении многостадийного гидролиза можно справиться, привела ли или нет предыдущая обработка к спорам в стадии выроста, что зависит в основном от условий используемых температур. Например, если используют трехстадийную процедуру гидролиза, то можно просто нагревать первый гидролизат, то есть солюбилизированный субстрат, при температуре и в течение времени, которые достаточны только для того, чтобы сделать жизнеспособные микроорганизмы нежизнеспособными, то есть только убивая микроорганизмы. В этом случае оставшиеся споры будут вынуждены перейти в то, что называется стадией выроста, хотя некоторые споры могут быть сделаны нежизнеспособными. После этого поддерживают условия в течение времени и при температуре, которые благоприятствуют тому, что споры регенерируются, превращаются в жизнеспособные микроорганизмы и растут, то есть примерно до 2 часов или около этого, а затем субстрат нагревают при температуре и в течение времени, которые достаточны для того, чтобы сделать микроорганизмы нежизнеспособными, посредством чего данная многоступенчатая процедура эффективно освобождает субстрат от жизнеспособных микроорганизмов и спор.

С практической точки зрения в плане трехстадийной процедуры гидролиза, стадии выроста позволяют протекать во время второй ступени гидролиза, а после этой ступени гидролизат нагревают для того, чтобы сделать микроорганизмы нежизнеспособными, посредством чего обеспечивается необходимый характер субстрата для обработки в процессе с использованием стерильного ферментного препарата. Поэтому обычно в этой процедуре можно использовать температуру и время, достаточные для того, чтобы инактивировать фермент(ы) и/или температуру, применяемую в обычных процедурах пастеризации. Таким образом, как правило, можно использовать температуры по порядку примерно не менее 80°C. Однако для подстраховки температура обычно составляет по порядку примерно не менее 90°C, а время достаточно для того, чтобы сделать микроорганизмы нежизнеспособными, то есть от примерно 5 минут до примерно 30 минут, и предпочтительно и наиболее выгодно использовать температуры порядка от примерно 90°C до примерно 110°C.

Нагревание для инактивации/пастеризации можно осуществлять периодически, предпочтительно при перемешивании или ином возмущении, используя впрыскивание пара, или резервуар с рубашкой, или подходящий пластинчатый теплообменник, с впрыскиванием пара или без него, либо

непрерывно в трубе, предпочтительно с использованием впрыскивания пара и статических перемешивающих элементов.

С другой стороны, для того чтобы получить субстрат без микроорганизмов и спор, субстрат, например гидролизат, можно периодически или непрерывно нагревать в суспензии паром с температурами по меньшей мере примерно 121°C под давлением 15 фунт/кв. дюйм (1 фунт/кв.дюйм=0,064 атм) (то есть при избыточном давлении около 1 бар) в течение по меньшей мере примерно 15 минут и в соответствии с принятыми в технике процедурами стерилизации при высоких или сверхвысоких температурах и в течение короткого времени. Эта процедура должна быть проведена, когда субстрат, обрабатываемый по настоящему изобретению, не подвергался воздействию условий, индуцирующих стадию выроста, как обсуждалось выше. Стерилизацию можно осуществлять с помощью средств, упомянутых выше в связи с процедурой инактивации/пастеризации, однако обычно ее наиболее выгодно проводят с помощью пара в непрерывном режиме, в трубе, содержащей статические перемешивающие элементы.

Белковые вещества, которые можно успешно обрабатывать в соответствии с настоящим изобретением, включают любое съедобное белковое вещество, в частности вещества, приемлемые в пищевом отношении. Кроме вышеуказанных конкретных веществ, такие белковые вещества включают мясо (включая мясо животных, птицы и рыбы), кости, коллаген, белки яичного белка и желтка и другие фосфопротеины и белоксодержащие экстракты из них, а также включают производные продуктов животного белка, такие как желатин. Такие вещества также включают молочные вещества, к которым относятся белки сыворотки и казеин, но не ограничивают их, а также включают белоксодержащие растительные вещества, которые не были упомянуты выше, такие как белоксодержащие семена масличных, в дополнение к бобам сои, включая обезжиренные бобы сои, белок риса и семена квиноа. Белковые вещества также могут включать несущие белки вещества и экстракты, полученные из микроорганизмов, включая дрожжевые клетки и т.п.

Используемый ферментный препарат зависит от его состава и активности (активностей) и его выбирают с точки зрения характеристики требуемого конечного продукта. Ферменты препарата могут быть природными, то есть выделенными из встречающихся в природе микроорганизмов или из генетически модифицированных микроорганизмов ("ГМО"), то есть продуктов с генами, которые были клонированы и/или сверхпродуцированы, или они могут быть ферментами, которые были генерированы мутагенезом. Также можно использовать ферменты, которые были модифицированы химически, например, иммобилизацией или инсолюбилизацией, включая нанесение на гранулы или биологические белки, или содержащие ПЭГ или пектин.

Хотя с точки зрения затрат наиболее эффективно использовать ферменты товарного сорта в том случае, когда особо

стремятся к наивысшей степени контроля профиля характеристик конечного продукта, можно использовать фермент наивысшей чистоты, а поскольку в способе по изобретению можно использовать меньшие количества фермента по сравнению с количествами, которые обычно используют для достижения подобного результата, например, подобной степени гидролиза и выхода продукта, очищенные и другие ферменты, которые ранее не полагались эффективными с точки зрения затрат, могут найти применения с эффективным соотношением затраты/прибыль.

Особенно в случае ферментов товарного сорта выбор может быть основан на активностях "примесей", то есть, как указывалось выше, содержащихся в ферментном препарате ферментов, иных, чем особенный фермент с доминирующей активностью. Как указано выше, в этом отношении можно обнаружить, что температурными условиями можно успешно манипулировать, чтобы повысить активность желательного доминирующего фермента и/или приглушить, или усилить активность таких "примесей", про которые известно, что они до этого не были предложены в прототипах. Более того, активные в психрофильном температурном диапазоне ферменты также могут найти конкретную применимость, особенно при работе в некоторых вышеуказанных предпочтительных температурных условиях по настоящему изобретению.

В случае обработки белков можно использовать любой протеолитический ферментный препарат и можно сослаться на работу Webb, ENZYME NOMENCLATURE (Номенклатура ферментов), NC-IUBMB, ACADEM PRESS Inc., 1992, в которой компилированы ферменты, их применения и направление расщепления в субстрате. В зависимости от характера субстрата и требуемых условий процесса могут быть выбраны любые кислотные, нейтральные или щелочные протеиназы.

Например, обычно протеолитические ферменты можно получить из животных и растительных источников и, в частности, из микробных источников, таких как *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*, *Bacillus subtilis*, *Mucor* sp. или *Rhizopus oryzae*. К таким ферментам относятся те, о которых говорилось в указанных здесь ранее документах и, например, в патенте США 3914346, описания которых включены сюда как ссылки. Однако успешно используют также трипсин и химо трипсин, хотя их обычно полагали дорогими для применения в промышленности для получения пищевых продуктов, а также в определенных случаях можно успешно использовать панкреатин, который обеспечивает как липолитическую, так и протеолитическую активность.

Однако, особенно из соображений затрат, при обработке в кислых условиях можно использовать кислотную протеиназу, которую можно получить от QUEST International из Сарасоты, Флорида, США и которая известна как препарат BIOCON Acid Protease или Acid Protease L. При обработке в нейтральных условиях успешно можно использовать нейтральную протеиназу, такую как

PROTEASE 2A, которую можно получить от Amano International Enzyme Co., Inc., из Трои, Вирджиния, США, а при обработке в щелочных условиях можно успешно использовать препарат ALKALASE 2.4L, который можно получить от Novo Nordisk A/S I3 Bagsvaerd, Дания.

Для получения продуктов с высоким содержанием свободных аминокислот можно использовать любой из различных препаратов экзопептидазы. Можно успешно использовать аминопептидазный фермент, такой как описан в патенте США 3914436, описание которого включено сюда как ссылка, хотя в зависимости от желаемых результатов, можно сделать выбор из любого фермента, идентифицированного в "Номенклатуре ферментов". Особенно пригодные аминопептидазные ферментные препараты включают препарат PEPTIDASE A AMANO, доступный от Amano, который, как будет замечено, также обладает эндопептидазной активностью. С успехом используют ферментный препарат COROLASE, который поставляется Rohm. Tech., Inc. из Malden MA, США, и который может иметь экзо- или эндопептидазную активность, и будет обнаружено, что COROLASE PP обладает активностью карбоксипептидазы В. Также успешно используются препараты FLAVOURENZYME от Novo, которые могут включать карбоксипептидазную активность. Также может быть обнаружено, что для гидролиза белка сои пригодны пептидазные ферменты PROMOD, доступные от BIOCATALYSTS LTD. Pontypield, Wales, Великобритания.

Как также будет понятно, можно использовать препараты карбоксипептидазы, идентифицированные в "Номенклатуре ферментов".

Для того чтобы получить продукты с высоким содержанием глутаминовой кислоты и/или глутамиловых пептидов, можно использовать "PGase", описанный в вышеупомянутом патенте Kikuchi 967, а также ферменты, идентифицированные в "Номенклатуре ферментов".

Хотя в указанных прототипах сделан упор на концентрации единиц активностей ферментов и ферментных препаратов, то есть единиц/г, например таких, как единицы Анс она/единицы производителя, для которых кросс-корреляция обычно затруднительная без проведения испытаний, эта величина не является переменной, которая критична или имеет какое-либо особое значение в плане осуществления концепции настоящего изобретения. Однако, конечно, нужно принимать во внимание указания производителя по активности, а также по рабочим концентрациям и характеристикам.

Кроме того, было обнаружено, что работа в соответствии с методиками по настоящему изобретению снижает общее количество фермента, используемое для достижения степени гидролиза, эквивалентной и, как правило, превышающей степень гидролиза, которая ожидается при работе по предшествующим методикам. Например, используемые количества фермента обычно могут быть примерно на 50% меньше, чем обычно рекомендуемые поставщиками ферментов и/или обычно используемые в каком-либо практическом применении. Как

будет подтверждено примерами ниже, желаемые результаты и высокие выходы могут быть получены при использовании количеств фермента порядка 1% или менее по весу на основе сухого веса субстрата.

Способ гидролиза по изобретению можно осуществлять с периодической загрузкой, пока обычной на уровне техники, или же по методикам, подобным описанным в вышеупомянутом патенте Jost. Можно также использовать непрерывный реактор с мембраной для ультрафильтрации, а также можно успешно использовать циркуляционные трубчатые реакторы, включая описанные Oosterhuis и др. в патенте США 5073496. Возможна непрерывная работа, так как описано Vaensch и др. в публикации европейской патентной заявки 0566877. Также можно привлечь внимание реакторы с закрепленным ферментом. Как будет понятно, в этом отношении изменение конфигураций оборудования и процесса обычно будет влиять на такие факторы, как кинетика реакции и пределы ингибирования реакции, вследствие изменения во времени соотношений между реагентами и продуктом реакции из-за различия в режимах работы.

Таким образом, как будет понятно далее из описаний Jost, в частности, гидролиз белков молока и, в особенности белков молочной сыворотки, можно осуществлять по меньшей мере за две стадии, используя ступени тепловой денатурации и ферменты, такие как трипсин, химотрипсин и панкреатин, а также препарат ALKALASE. Однако в соответствии с настоящим изобретением, с целью достижения характеристик конечного продукта, конечную стадию гидролиза проводят в стерильной системе с помощью стерильного фермента и с использованием гидролизата, не содержащего жизнеспособные мезофильные микроорганизмы и споры.

При проведении многостадийного процесса условия обработки, которые используются для осуществления ферментативной процедуры по изобретению, могут включать любое из различных условий, достаточных для оптимизации солюбилизации и/или скорости реакции гидролиза и выхода продукта, которые известны на уровне техники. Однако обычно желательно, чтобы рабочие температурные условия для процедур протеолиза, используемых перед применением способа по настоящему изобретению, были выше мезофильного диапазона, что поможет индуцировать вырост спор, и для ингибирования роста микроорганизмов такие температуры предпочтительно превышают 50°C, что является обычным на уровне техники.

Как указано выше, способ по изобретению выгодно осуществлять при температуре ниже мезофильного диапазона и, предпочтительно, ниже примерно 17°C, что дополнительно снижает потенциальное загрязнение нежелательными микроорганизмами. Хотя такие температуры могут лежать ниже оптимальных диапазонов для множества белков и, таким образом, снижать скорость реакции, реакцию можно проводить в течение более длинных периодов времени, которые имеют порядок дней, а не часов, и ее можно

проводить после того, как скорость реакции начинает уменьшаться. Как указано выше, выгодно использовать количества фермента порядка 1% на основе веса субстрата или менее.

5 Если не используют мембранный реактор, после проведения гидролиза в соответствии с настоящим изобретением в течение требуемого времени можно нагревать весь гидролизат, то есть супернатант и твердое вещество прогидролизованного субстрата (здесь твердое вещество называется "гранулированным субстратом") до температуры и в течение времени, которые по меньшей мере достаточны для инактивации фермента (ферментов), или при температуре и времени, которые достаточны для того, чтобы получить пастеризованный или стерильный асептический продукт. В последнем случае, при желании, продукт может быть упакован в асептических условиях. С другой стороны, супернатант можно отделить от гранулированного субстрата, что может быть при использовании мембранного реактора в непрерывном режиме, и обработать в таком виде. Однако обычно отделение супернатанта от гранулированного субстрата можно осуществить путем фильтрования, но, предпочтительно, центрифугированием, которое, как правило, обеспечит более высокие выходы супернатанта, или комбинацией фильтрования и центрифугирования.

10 15 20 25 30 35 40 В альтернативном случае инактивированный ферментом супернатант и гранулированный субстрат вместе или отделенный от гранулированного субстрата супернатант можно использовать так таковой, или супернатант можно скоцентрировать, например, испарением в вакууме, или высушить по любой из различных известных на уровне техники методик сушки, включая, в частности, распылительную сушку или лиофильную сушку. В еще одном альтернативном случае супернатант можно подвергнуть ультрафильтрации или другой методике разделения/ фракционирования, чтобы получить фракции продукта.

45 50 55 Кроме того, выходы продукта могут быть дополнительно увеличены путем обработки гранулированного субстрата, от которого был отделен супернатант, тем же самым ферментным препаратом или отличающимся ферментным препаратом. В этом отношении было обнаружено, что гранулированный субстрат задерживает немалые количества продукта-гидролизата даже после, например, центрифугирования. Этот продукт можно удалить из гранулированного субстрата, например, прессованием или его экстракцией. Также было обнаружено, что характер и состав этого гидролизата отличаются от таковых для ранее удаленного супернатанта. Кроме того, оставшийся гранулированный субстрат можно дополнительно прогидролизовать.

60 Дополнительно следует отметить, что способ по изобретению можно осуществлять с ферментами, которые последовательно добавляют за одну или несколько стадий в различные моменты времени, что позволяет достичь дополнительной подгонки продукта к требованиям и/или увеличения выхода. Например, в определенный период времени

можно использовать фермент или ферменты для получения продукта, преимущественно содержащего ди-, три-, и/или полипептиды, а затем можно добавить ферментный препарат с особой активностью для расщепления пептидов, сдвигая таким образом равновесие реакции с целью одновременного увеличения получения ди-, три- и/или полипептидных продуктов. Иллюстрацией этому является использование вначале ферментного препарата для получения глутамина, а затем, пока идет реакция, введение ферментного препарата, пригодного для расщепления глутамина с целью получения глутаминовой кислоты. Аналогично, для получения пролина можно успешно использовать х-пролилдипептидазу (pro-x) и x-pro-дипептидазы.

Кроме того, для достижения высоких содержаний свободных аминокислот по настоящему изобретению можно, в частности, успешно использовать проназу, внеклеточные белки, выделяемые *Streptomyces griseus*, и их можно использовать одни, или в комбинации с другими ферментами, или последовательно с ними. Кроме того, обнаружено, что подходит микробная коллагеназа, клозтридипептидаза А, сама по себе или вместе с другими ферментными препаратами, пригодными для гидролиза коллагена.

Как указано выше, настоящее изобретение особенно полезно использовать для гидролиза клейковины пшеницы, белка сои и белка кукурузы в многоступенчатом процессе, в котором применяют экзопептидазу, в особенности аминопептидазу, которая на последней ступени в соответствии со способом по настоящему изобретению позволяет достичь высокой степени гидролиза. Будет обнаружено, особенно при определенных описанных ниже вариантах осуществления изобретения, что выход свободных аминокислот и пептидов с молекулярным весом менее приблизительно 2,000 Дальтон (то есть с длиной цепи до 20 аминокислот), которые содержатся в супернатанте после гидролиза и в гранулированном субстрате, составляет порядка не менее 65%, а обычно от примерно 65% до по меньшей мере около 80%. Можно обнаружить, что количества свободных аминокислот в супернатанте по порядку составляют от примерно 40% до примерно 60%.

Предполагается, что в последующем обсуждении упоминание о щелочных условиях означает и включает среду с pH около 7,5 и выше и в особенности с pH от примерно 8 до 12, а более конкретно - от примерно 8,5 до 11. Предполагается, что нейтральные условия означают и включают среду с pH от примерно 6,5 до примерно 7,5 и предполагается, что кислотные условия означают и включают среду с pH ниже примерно 6,5, в частности, от примерно 2 до примерно 6,5, а более конкретно - от примерно 3 до 4.

Для того чтобы легко достичь вышеуказанных результатов при воплощении настоящего изобретения в случае субстрата из белка кукурузы, последний по меньшей мере частично солюбилизируют в таких щелочных условиях, что он находится в состоянии, подходящем для атаки протеолитическими ферментами. Первую

ступень гидролиза, которой может предшествовать стадия термической денатурации, осуществляют в щелочных условиях с помощью протеиназы, которая активна в щелочных условиях. Успешно применяется ферментный препарат ALKALASE 2,4L, и реакцию проводят в течение такого времени, что реакция стремится быть ингибированной, то есть до момента уменьшения скорости реакции, хотя не предполагается исключить и большие времена.

После первой ступени гидролиза протеолизированный кукурузный субстрат нагревают при температуре и в течение времени, которые достаточны для того, чтобы сделать мезофильные микроорганизмы и споры нежизнеспособными. Так как обработка белка кукурузы таким образом приведет к желаемым результатам только в двухступенчатой процедуре гидролиза, нагревание следует осуществлять так, чтобы субстрат содержался при температуре примерно не менее 121°C в течение примерно не менее 15 минут под давлением примерно не менее 15 фунт/кв. дюйм (около 1 бар). Затем нагретый гидролизат охлаждают и обрабатывают стерильным ферментным препаратом в стерильной системе в соответствии с вышеописанным настоящим изобретением для гидролиза пептидов, предпочтительно с использованием экзопептидазы и предпочтительно в течение периода времени, длящегося по меньшей мере до тех пор, пока скорость гидролиза не начнет уменьшаться. Успешно используется препарат PEPTIDASE A AMANO.

В случае белка пшеницы, в частности клейковины, проводят трехстадийный процесс гидролиза. Белок помещают в кислую среду, то есть в подкисленную воду, а затем сперва обрабатывают кислотной протеиназой для по меньшей мере частичной солюбилизации интактного белка и инициирования гидролиза, и эту реакцию можно осуществлять до тех пор, пока скорость реакции не начнет уменьшаться, хотя не предполагается исключить большие времена. Успешно используют препарат кислотной протеиназы BIOCON. Реакционную смесь нейтрализуют и нагревают для того, чтобы инактивировать ферментный препарат и сделать мезофильные микроорганизмы нежизнеспособными, например, путем нагревания при примерно 100 °C -110°C в течение примерно не менее 5 минут, но обычно предпочтительно в течение примерно не менее 10 минут.

После охлаждения субстрат обрабатывают нейтральной протеиназой для того, чтобы гидролизовать пептиды и все интактные белки, и получают второй гидролизат; эту реакцию также можно проводить до тех пор, пока скорость реакции не начнет уменьшаться, хотя не предполагается исключить более длительные времена. Успешно используют препарат PROTEASE 2A. Данный второй гидролизат также проводят для того, чтобы вызывать стадию выроста спор, и, таким образом, среду субстрата нужно только обработать теплом, чтобы инактивировать ферментный препарат и сделать мезофильные микроорганизмы нежизнеспособными, так же, как указано выше. Однако не предполагается исключить

применение процедуры стерилизации.

После охлаждения второй гидролизат обрабатывают стерильным ферментным препаратом в стерильной системе в соответствии с вышеописанным настоящим изобретением для того, чтобы гидролизовать пептиды, предпочтительно экзопептидазой и предпочтительно в течение времени по меньшей мере до момента, когда скорость гидролиза начинает уменьшаться, хотя не предполагается исключить более длительные времена. Также успешно используют препарат PEPTIDASE A AMANO.

В случае белка сои, также используют трехстадийную процедуру гидролиза. Белок суспендируют в воде в щелочных условиях и обрабатывают в щелочной среде щелочной протеиназой, которая дополнительно солибилизирует белок и осуществляет гидролиз; данную реакцию можно проводить до тех пор, пока скорость реакции не начнет уменьшаться, хотя не предполагается исключить более длительные времена. С успехом используют препарат ALKALASE 2,4L, и может обнаружиться, что перед окончанием данной первой стадии гидролиза будет полезно снизить pH до нейтрального диапазона, хотя не следует полагать, что это необходимо.

Если реакционная среда первого соевого гидролизата не была ранее нейтрализована, ее можно нейтрализовать и затем нагреть для того, чтобы инактивировать ферментный препарат и сделать мезофильные микроорганизмы нежизнеспособными, например, нагреванием при примерно 100-110 °C в течение по меньшей мере примерно 5 минут, но обычно предпочтительно в течение примерно не менее 10 минут.

После охлаждения первый гидролизат обрабатывают в нейтральных условиях нейтральной протеиназой для того, чтобы гидролизовать пептиды и все интактные белки, и получают второй гидролизат; эту реакцию также можно проводить до тех пор, пока скорость реакции не начнет уменьшаться, хотя не предполагается исключить более длительные времена. Также успешно используют препарат PROTEASE 2A. Данный второй гидролизат также проводят для того, чтобы провести стадию выроста спор, и, таким образом, среду субстрата нужно только обработать теплом, чтобы инактивировать ферментный препарат и сделать мезофильные микроорганизмы нежизнеспособными, так же, как указано выше. Однако также не предполагается исключить применение процедуры стерилизации.

После охлаждения второй гидролизат обрабатывают стерильным ферментным препаратом в стерильной системе в соответствии с вышеописанным настоящим изобретением для того, чтобы гидролизовать пептиды предпочтительно экзопептидазой и предпочтительно в течение времени по меньшей мере до момента, когда скорость гидролиза начинает уменьшаться. Также успешно используют препарат PEPTIDASE A AMANO.

Как будет понятно из предыдущего обсуждения, проводя процесс в соответствии с настоящим изобретением, можно получить любые известные продукты-гидролизаты и использовать их любыми различными

известными путями. К таким продуктам и применениям относятся пищевые продукты и применения, включая гипоаллергенные продукты, такие как детское питание или продукты, которые специально приспособлены для конкретного применения, включая лечение людей, нуждающихся в одной или нескольких свободных аминокислотах или в небольших пептидах, то есть с 2-5 аминокислотами, или их использование для дальнейшей переработки с целью получения дальнейших продуктов. В частности, гидролизаты с высоким содержанием свободных аминокислот и/или их фракции можно успешно использовать как ароматизаторы как таковые или как предшественники других продуктов, включая, в частности, предшественников для производства ароматизаторов, например, с помощью реакции Майяра или других реакций для получения ароматизатора.

ПРИМЕРЫ

Последующие примеры приведены для того, чтобы дополнительно проиллюстрировать настоящее изобретение. Если не указано иначе, процентные содержания приведены по весу, а пропорции - по отношению объем/объем.

Методики испытаний

Общее содержание аминокислот в продукте определяют путем гидролиза лиофилизированного продукта соляной кислотой, после чего проводят процедуры ЖХВД. Образец вносят вместе с 6M HCl в трубку Пирса для гидролиза и перемешивают. Для облегчения внесения образца в вакуум содержащийся в трубке образец замораживают, прикладывают вакуум для образования вакуума в трубке, и трубки герметично закрывают. Затем образец в вакууме нагревают при примерно 110°C в течение примерно 24 часов, чтобы провести гидролиз. После охлаждения полученный гидролизат сушат в вакууме и высушенный образец суспендируют в разбавляющем буфере Пикеринга 2,2. Образец в буфере Пикеринга микроцентрифугируют и проводят ультрафильтрацию супернатанта через мембрану, отсекающую вещества с MW более 30,000. Аликвоту помещают в колонку Пикеринга для аминокислотного анализа, которую используют с системой ЖХВД varian 5500. Аминокислоты элюируют при градиенте pH и обнаруживают после послеклоночной реакции с кингидрином, которую проводят в устройстве Пикеринга.

Количество свободных аминокислот в продукте определяют путем суспендирования образца в разбавляющем буфере Пикеринга 2,2 и дальнейшего центрифугирования, фильтрования и анализа, как описано выше.

Подсчеты клеток осуществляют, проводя десятикратные серийные разбавления образца в водном стерильном регенерационном разбавителе, содержащем 8,5 г NaCl и 1 г пептона на литр. Аликвоты образцов в разбавителе объемом 0,1 мл распределяют на агаровые чашки для чашечного подсчета (АЧЧП) DIFCO. Пластины инкубируют при 37°C в течение примерно 2 дней и подсчитывают колонии.

Пример 1.

Приблизительно 2 л 0,19% раствора ортофосфорной кислоты, полученного с использованием деионизированной воды,

нагревают в колбе до примерно 75°C. К раствору кислоты добавляют 200 г клейковины пшеницы и смесь перемешивают с высокой скоростью в смесителе WARING, чтобы перевести клейковину в суспензию. Перед окончанием перемешивания в подкисленную суспензию добавляют 0,5 г кислотной протеиназы (BIOCON 200,000 биол. ед/г), чтобы достичь содержания препарата в субстрате около 0,25% на основе веса субстрата клейковины. Обнаружено, что суспензия имеет pH около 3,5.

Подкисленную смесь клейковина/фермент вносят в колбу, которую закрывают и помещают в инкубатор со встряхиванием. Колбу и ее содержимое трясут достаточно сильно, чтобы поддерживать смесь клейковина/фермент в суспендированном состоянии, и нагревают при примерно 60°C в течение около 16 часов; данная инкубация проводится для того, чтобы частично солюбилизировать интактные белки, инициировать реакцию гидролиза и получить реакционную смесь субстрата (гидролизат 1). После инкубации из гидролизата 1 отбирают образец для подсчета клеток, который указывает, что число клеток микроорганизма меньше, чем 300 КОЕ/мл.

К субстрату гидролизата 1 добавляют 2,5 M NaOH в

количестве, достаточном для того, чтобы повысить pH смеси до примерно 6,2, и перемешивают с ним. Колбу закрывают, помещают в автоклав и нагревают при примерно 104°C в течение приблизительно 5 минут для того, чтобы инактивировать ферментный препарат и сделать мезофильные микроорганизмы нежизнеспособными, что также денатурирует пептиды. Колбу и нагретый гидролизат 1 охлаждают до примерно 50°C.

К охлажденному гидролизату 1 добавляют один грамм препарата PROTEASE 2A (>20,000 единиц Amano/г), чтобы получить препарат в количестве около 0,5% на вес изначально используемой клейковины. Колбу закрывают и помещают в инкубатор со встряхиванием, и суспензию гидролизат I/фермент нагревают до температуры примерно 50°C в течение примерно 7 часов при встряхивании, достаточном для того, чтобы поддерживать смесь в виде суспензии, и получают второй продукт-гидролизат (гидролизат II); это также приводит к стадии роста спор, приводящей к микроорганизмам. Отбирают образец для подсчета клеток, который указывает, что число клеток меньше $2 \cdot 10^3$ КОЕ/мл.

Колбу, содержащую гидролизат II, закрывают, помещают в автоклав и нагревают при примерно 104°C в течение приблизительно 10 минут, что осуществляется для того, чтобы инактивировать протеиназу, снова денатурировать пептиды (и все оставшиеся интактные белки) и сделать мезофильные микроорганизмы нежизнеспособными. После этого закрытую колбу и нагретый гидролизат II охлаждают до комнатной температуры (~22,5°C).

2 г препарата PEPTIDASE A AMANO (>100,000 единиц Amano для аминоклотаза/г) суспендируют в 15 мл стерильной воды, содержащейся в

стерильном стакане. Суспензию фильтруют в асептических условиях через 0,45 мкм мембранный фильтр в охлажденный гидролизат II, чтобы получить концентрацию ферментного препарата около 1% на основе изначально используемой клейковины, и колбу закрывают.

Реакционную смесь аминоклотаза/гидролизат II охлаждают в закрытой колбе до температуры примерно 14°C и, чтобы получить следующий продукт-гидролизат (гидролизат III), смесь выдерживают при примерно 14°C в течение примерно 7 дней, во время чего колбу встряхивают по меньшей мере ежедневно для того, чтобы суспендировать выделившиеся твердые вещества. Отбирают образец для подсчета клеток, который указывает, что число клеток составляет 0 КОЕ/мл, то есть то, что нет обнаруживаемого роста микроорганизмов. После этого гидролизат III нагревают при примерно 104°C в течение приблизительно 5 минут, чтобы инактивировать фермент.

Гидролизат III центрифугируют при примерно 5,000 об/мин в течение примерно 5 минут, что приводит к супернатанту и гранулированному субстрату.

Супернатант лиофилизируют и получают 122 г лиофилизованного материала.

Отбирают образцы лиофилизованного материала. Аминокислотный анализ показывает, что материал содержит в сумме около 64,3% аминокислот и что примерно 39,8% от всего количества аминокислот являются свободными аминокислотами.

Сравнительный пример А.

2 л 0,425% раствора ортофосфорной кислоты нагревают так же, как в примере 1, добавляют 200 г клейковины пшеницы и перемешивают ее с раствором так же, как в примере 1. Как и в примере 1, к подкисленной суспензии клейковины добавляют 4 г кислотной протеиназы (BIOCON 200,000 биол.ед./г), чтобы получить препарат в количестве около 2% по отношению к субстрату клейковины. Подкисленную смесь клейковина/фермент встряхивают и инкубируют так же, как в примере 1, за исключением того, что ее нагревают при примерно 65°C и только в течение примерно 5,5 часов. По окончании этой процедуры, которая приводит к субстрату реакционной смеси (гидролизат IA), отбирают образец для подсчета клеток, который указывает, что число клеток меньше 300 КОЕ/мл.

pH гидролизата IA поднимают до примерно 6,3 с помощью 2,5 M NaOH, а затем гидролизат IA нагревают в автоклаве, как в примере 1, в течение примерно 5 минут, а затем охлаждают до примерно 45°C.

К охлажденному гидролизату IA добавляют 4 г препарата PEPTIDASE A AMANO (>100,000 единиц Amano /г), что обеспечивает концентрацию ферментного препарата около 2% на основе изначально используемой клейковины. Реакционную смесь аминоклотаза/гидролизат IA инкубируют при примерно 45°C в течение примерно 6 часов и получают следующий продукт-гидролизат (гидролизат ША). Отбирают образец для подсчета клеток, который указывает на число клеток около 7,500 КОЕ/мл, что говорит о том, что

микроорганизмы растут и что с учетом времени реакции может свидетельствовать о том, что число микроорганизмов приблизительно удваивается за каждый час.

Гидролизат IIA центрифугируют и супернатант осушают лиофильной сушкой как в примере 1. Определение аминокислот указывает на то, что лиофилизированный материал содержит всего около 68,1% аминокислот, и примерно 26,6% от общего содержания аминокислот составляют свободные аминокислоты.

Сравнительный пример Б.

Эксперимент проводят в соответствии с методиками сравнительного примера А, за исключением того, что для каждой из реакций гидролиза протеиназой и аминопептидазой используемые количества ферментного препарата составляют 1%, за исключением того, что кислотный протеолиз проводят около 14 часов, за исключением того, что первый продукт-гидролизат нагревают за 10 минут и за исключением того, что гидролиз аминопептидазой проводят при pH 7,3 в течение около 5 1/2 часов при 45°C, а затем 1 час при 60°C.

Леофилизированный материал содержит всего около 62,7% аминокислот и около 24,2% от всех аминокислот являются свободными аминокислотами. После кислотного протеолиза подсчет клеток составляет менее 10 КОЕ/мл, а после гидролиза аминопептидазой количество клеток меньше, чем 15 КОЕ/мл.

Пример 2.

200 г кукурузного белка добавляют в примерно 2 л деионизированной воды, содержащейся в колбе и имеющей температуру около 75°C. Для постепенного доведения pH смеси до примерно 8,5 к воде и кукурузному белку время от времени добавляют порциями 2,5 М NaOH при встряхивании колбы и ее содержимого с помощью вибратора инкубатора с целью смешения ингредиентов и суспендирования белка. Во время перемешивания белок частично солюбилизирован и перед окончанием перемешивания в суспензию субстрата кукурузного белка добавляют 3 мл препарата ALKALASE 2,4L и перемешивают с ней, чтобы получить препарат в концентрации около 1,5% на основе веса кукурузного белка.

Для того чтобы получить первый продукт-гидролизат (гидролизат I), колбу накрывают и суспензию субстрат/фермент достаточно трясут в течение примерно 7 часов, чтобы поддержать смесь кукурузный белок/фермент в суспендированном виде при одновременном нагревании при примерно 55 °C. Для того чтобы поддержать pH на уровне примерно 8, в течение первых 6 часов периодически добавляют 2,5 М NaOH, а затем во время седьмого часа допускают падение pH. Отбирают образец для подсчета клеток, который говорит о том, что число клеток микроорганизмов меньше, чем 1,000 КОЕ/мл.

Накрытую колбу и гидролизат I нагревают в автоклаве при примерно 121°C под давлением примерно 15 фунт/кв. дюйм в течение примерно 15 минут, а затем оставляют охлаждаться до комнатной температуры (~22,5°C).

2 г препарата PEPTIDASE A AMANO (>100,000 единиц аминопептидазы Amano/g)

суспендируют в 15 мл воды и фильтруют в асептических условиях через 0,45 мкм мембранный фильтр в охлажденный гидролизат I, чтобы получить концентрацию ферментного препарата около 1% на основе изначально используемого кукурузного белка, и колбу накрывают.

Чтобы получить второй продукт-гидролизат (гидролизат II), реакционную смесь

аминопептидаза/гидролизат I охлаждают до примерно 14°C и держат при этой температуре в течение примерно 6 1/2 дней при встряхивании, как в примере 1. Затем отбирают образцы для подсчетов клеток, которые показывают 0 КОЕ/мл.

Гидролизат II центрифугируют при 5,000 об/мин в течение примерно 5 минут и получают супернатант и гранулированный субстрат. Супернатант лиофилизирован и получают 161 г продукта.

Леофилизированный материал содержит всего около 43,9% аминокислот, и примерно 48% от общего количества аминокислот составляют свободные аминокислоты.

Пример 3.

Проводят эксперименты в соответствии с методиками по примеру 1, однако с температурами инкубирования гидролизата II с аминопептидазой, которые указаны в последующей таблице. Образцы для определения содержания свободных аминокислот в супернатанте в виде процентного содержания от всего количества аминокислот отбирают в различные моменты времени, что также указано в таблице, причем тире означают, что образцы не анализировали.

Пример 4.

200 г муки бобов сои добавляют в 2000 мл воды в колбе и встряхивают на платформе вибратора при температуре примерно 60°C в течение примерно 30 минут, чтобы суспендировать муку. К суспензии добавляют 2,5 М NaOH в количестве, достаточном для доведения ее pH до примерно 8. К суспензии с доведенным pH добавляют 3,5 мл препарата ALKALASE 2,4L, нагревают при 60 °C в течение примерно 8 часов и получают первый гидролизат (гидролизат I).

К гидролизату I добавляют фосфорную кислоту в количестве, достаточном для доведения его pH до примерно 6,5, и затем этот гидролизат I с доведенным pH нагревают в автоклаве при температуре около 104°C в течение примерно 5 минут, после чего охлаждают.

К охлажденному гидролизату I добавляют один грамм препарата PROTEASE 2A (>20,000 единиц Amano/g, 0,5% фермент), инкубируют в инкубаторе с вибратором при 50 °C в течение примерно 5 часов и получают второй продукт-гидролизат (гидролизат II). Гидролизат II нагревают в автоклаве при 121 °C в течение 15 минут при давлении около 15 фунт/кв. дюйм, а затем охлаждают.

2 г препарата PEPTIDASE A AMANO (>100,000 единиц Amano /g) стерилизуют, как в вышеприведенных примерах, и стерильный ферментный препарат добавляют к охлажденному гидролизату II, что обеспечивает концентрацию препарата около 1% по отношению к изначально используемой соевой муке. Температуру гидролизата II и

препарата понижают до примерно 16°C, инкубируют с вибратором инкубатора в течение примерно 4 дней и получают следующий продукт-гидролизат (гидролизат III).

Гидролизат III нагревают, чтобы инактивировать ферментный препарат, охлаждают и центрифугируют, как в вышеприведенных примерах. Супернатант лиофилизируют и получают около 83 г лиофилизованного материала, который содержит около 45% свободных аминокислот как процент к общему количеству аминокислот.

Как ясно из упомянутого выше, могут быть произведены различные модификации настоящего изобретения без отклонения от сущности и объема описания, и изобретение может быть осуществлено и/или внедрено в практику подходящим образом в отсутствие и/или вплоть до исключения стадий процесса и/или операций, условий, веществ и/или ингредиентов, с которыми обращаются, и/или ограничений", о которых здесь конкретно не говорится.

Формула изобретения:

1. Способ получения съедобного гидролизата, предусматривающий стадии гидролиза белкового вещества растительного происхождения для получения гидролизного субстрата, нагревания гидролизного субстрата, гидролиза гидролизного субстрата, отличающийся тем, что гидролиз белкового вещества осуществляют протеолитическим ферментным препаратом, полученный гидролизный субстрат нагревают при температуре и в течение времени, достаточных для получения субстрата, лишённого мезофильных микроорганизмов и спор, а гидролиз гидролизного субстрата, лишённого мезофильных микроорганизмов и спор, проводят в стерильной системе стерильным ферментным препаратом, причем указанный стерильный ферментный препарат представляет собой препарат экзопептидазы и проназы.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что субстрат гидролизуют при температуре от примерно 0 до примерно 45°C.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что субстрат гидролизуют при температуре от примерно 0 до примерно 20°C.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что субстрат гидролизуют при температуре от примерно 20 до примерно 40°C.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный пригодный для гидролиза субстрата ферментный препарат включает препарат экзопептидазы.

6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанное белковое вещество содержит интактные белки.

7. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что указанное белковое вещество является кукурузой, которую гидролизуют в щелочных условиях.

8. Способ получения съедобного гидролизата, предусматривающий стадии обработки приемлемого в пищевом

отношении белкового вещества растительного происхождения протеолитическим ферментным препаратом для солюбилизации белка этого вещества с получением по меньшей мере частично солюбилизованного вещества, нагревание этого по меньшей мере частично солюбилизованного вещества при температуре и в течение времени, достаточных для получения термообработанного вещества, лишённого жизнеспособных мезофильных микроорганизмов, гидролиз этого термообработанного вещества, лишённого жизнеспособных мезофильных микроорганизмов, для получения гидролизного субстрата, нагревание этого гидролизного субстрата при температуре и в течение времени, достаточных для получения субстрата, лишённого жизнеспособных мезофильных микроорганизмов и спор, гидролиза лишённого жизнеспособных мезофильных микроорганизмов и спор субстрата в стерильной системе стерильным ферментным препаратом, пригодным для гидролиза этого субстрата, причем указанный стерильный ферментный препарат представляет собой препарат экзопептидазы и проназы.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что для получения субстрата, лишённого жизнеспособных мезофильных микроорганизмов и спор, термообработанное вещество гидролизуют при температуре и в течение времени, благоприятных для регенерации спор, их превращения в жизнеспособные микроорганизмы и роста, после чего белковый субстрат нагревают при температуре и в течение времени, достаточных для получения субстрата, лишённого мезофильных микроорганизмов.

10. Способ по п. 8 или 9, отличающийся тем, что субстрат гидролизуют при температуре от примерно 0 до примерно 45 °C.

11. Способ по п. 8 или 9, отличающийся тем, что субстрат гидролизуют при температуре от примерно 0 до примерно 20 °C.

12. Способ по п. 8 или 9, отличающийся тем, что субстрат гидролизуют при температуре от примерно 20 до примерно 40 °C.

13. Способ по любому из пп. 8-12, отличающийся тем, что указанное белковое вещество содержит клейковину пшеницы и эту клейковину обрабатывают в кислой среде кислой проназой для получения по меньшей мере частично солюбилизованного вещества, а термообработанное вещество гидролизуют нейтральной протеиназой.

14. Способ по любому из пп. 8-12, отличающийся тем, что указанное белковое вещество содержит соевый белок и этот соевый белок обрабатывают в щелочной среде щелочной протеиназой для получения по меньшей мере частично солюбилизованного вещества, а термообработанное вещество гидролизуют нейтральной протеиназой.

Время (часы)	Температуры		
	40°C	29°C	17°C
Свободные аминокислоты, %			
0	17,25	17,25	17,25
5	26,7	25,6	—
9	28,8	25,9	—
12	32,3	31,6	—
27,5	34,7	37	23,3
54	41,9	45	30
96	—	—	35,4
168	—	—	42,9

RU 2185075 C2

RU 2185075 C2