



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 36 247 T2** 2007.05.24

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 969 736 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 36 247.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK97/00230**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 921 649.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1997/043910**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.05.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **27.11.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.01.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **28.06.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.05.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A23J 3/34 (2006.01)**  
**A23J 3/30 (2006.01)**

(30) Unionspriorität:  
**58596 20.05.1996 DK**

(73) Patentinhaber:  
**Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK**

(74) Vertreter:  
**Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler  
Wichmann Huhn, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**BE, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE**

(72) Erfinder:  
**NIELSEN, Munk, Per, DK-2880 Bagsvaerd, DK**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON PROTEINHYDROLYSATE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Fachgebiet

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erhalt von Protein-Hydrolysaten, die als Aromastoffe geeignet sind. Insbesondere stellt die Erfindung ein Verfahren zum Erhalt eines Hydrolysats, das mit glutaminfreier Säure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäure-Resten aus proteinartiger Substanz angereichert ist, bereit, wobei das Verfahren die Schritte umfasst, wobei das Substrat einem Deamidierungsverfahren unterzogen und das Substrat der Wirkung eines spezifisch wirkenden proteolytischen Enzyms unterworfen wird.

## Technischer Hintergrund

**[0002]** Verschiedene Lebensmittelprodukte, z.B. Suppen, Saucen und Würzmittel, umfassen Aromastoffe, die durch Hydrolyse von proteinartigen Materialien erhalten werden. Herkömmlicherweise wird diese Hydrolyse durch die Verwendung starker Chlorwasserstoffsäure und anschließende Neutralisation mit Natriumhydroxid bewirkt. Jedoch führt eine derartige chemische Hydrolyse zu einem starken Abbau der Aminosäuren, die während der Hydrolyse erhalten werden und auch zu gesundheitsschädlichen Nebenprodukten, die sich im Verlauf dieser chemischen Reaktion bilden. Daher hat die wachsende Besorgnis bezüglich der Verwendung von Aromastoffen, die durch chemische Hydrolyse erhalten werden, zur Entwicklung enzymatischer Hydrolyseverfahren geführt.

**[0003]** Der Zweck enzymatischer Hydrolyseverfahren ist der Erhalt eines hohen Hydrolysegrades (DH), und dieser wird im allgemeinen durch die Verwendung eines Komplexes aus unspezifisch wirkenden proteolytischen Enzymen (d.h. unspezifisch wirkende Endo- und Exopeptidasen) erreicht. So beschreibt z.B. WO 94/25580 ein Verfahren zur Hydrolyse von Proteinen durch die Verwendung einer aus *Aspergillus oryzae* erhaltenen unspezifisch wirkenden Enzymzubereitung. Spezifisch wirkende proteolytische Enzyme wurden für diesen Zweck bisher noch nicht verwendet, da solche Enzyme nur zu einem unzureichenden Hydrolysegrad führen.

**[0004]** Bisher wurden nur relativ wenige spezifisch wirkende proteolytische Enzyme beschrieben. Somit wurde von proteolytischen Enzymen berichtet, die vorzugsweise Peptide an Glutamoyl-Peptid-Bindungen (Glu-spezifische Proteasen) spalten, erhalten aus *Staphylococcus aureus* [Drapeau G. R., Boily Y. and Houmard J., J. Biol. Chem. 1972, 247 (20)6720–6726], aus *Actinomyces* sp. [Mosolova O. V., Rudenskaya G. N., Stepanav V. M., Khodava O. M., Tsaplina I. A.; Biokhimiya 1987, 52(3)414–422], aus *Streptomyces griseus* [Yoshida N., Tsuruyama S., Nagata K., Hirayama K., Noda K. and Makisumi S., J. Biochem. 1988, 104,451–456], aus *Streptomyces thermovulgaris* [Khaldarova N. Y., Rudenskaya G. N., Revina L. P., Stephanov V. M. and Ergorov N. S. Biochimiiia Moscow Eng. 1989, 54 (1),32–38], aus *Bacillus subtilis* [Niidome T., Yoshida N. Ogata F. Ito A. and Noda K., J. Biochem. 1990, 108,965–970] und aus *Bacillus licheniformis* [WO 91/13554A1].

**[0005]** Glu-spezifische Proteasen finden hauptsächlich bei Studien der Proteinstrukturen Anwendungen. Jedoch wurden die Verwendung einer Glu-spezifischen *Staphylococcus aureus*-Protease zur Modifizierung der Löslichkeit und die strukturellen Eigenschaften von Casein beschrieben [Chobert J.-M., Sitohy M.Z. and Whitaker J. R., J.Agric. Food Chem. 1988, 36,220–224], und WO 91/13554 A1 beschreibt die Verwendung des *Bacillus licheniformis*, um eine begrenzte spezifische Hydrolyse von Proteinen zu erhalten.

**[0006]** Während Glutamin (Gln) nahezu geschmacklos ist, spielt Glutaminsäure (Glu), gleich ob frei oder peptidgebunden, für das Aroma und die Schmeckhaftigkeit der Proteinhydrolysate eine bedeutende Rolle. Glutaminsäure kann durch die Umwandlung von freiem Glutamin zu Glutaminsäure gebildet werden. Diese Umwandlung (d.h. Deamidierung) erfolgt schon von Natur aus während der herkömmlichen Hydrolyse unter Verwendung starker Chlorwasserstoffsäure.

**[0007]** Alternativ kann Glutaminsäure aus freiem Glutamin durch die Einwirkung einer Glutaminase (L-Glutaminase, EC 3.5.1.22 oder D-Glutaminase, EC 3.5.1.35) gebildet werden. Allerdings können beträchtliche Mengen des Glutamins verloren gehen, wenn es sich spontan zu Pyroglutamin umwandelt.

**[0008]** Im Gegensatz zu Glutaminase wirkt Peptidoglutaminase (PGasen) auf peptidgebundenen Glutamin. Es sind zwei Typen von Peptidoglutaminasen bekannt. Peptidylglutaminase (EC 3.5.1.43, Peptidoglutaminase I), die auf Glutamin, das an der  $\alpha$ -Aminogruppe substituiert ist, spezifisch ist, und Protein-Glutamin-Glutaminase (EC 3.5.1.44, Peptidoglutaminase II), die auf Glutamin, das an der Carboxylposition oder sowohl an der

$\alpha$ -Amino- als auch an der Carboxylposition substituiert ist, spezifisch ist. Es wurde von Peptidoglutaminasen berichtet, die aus *Aspergillus japonicus*, *Bacillus circulans*, *Cryptococcus albidus* und *Debaryomyces kloeckeri* erhalten wurden [Kikuchi M. & Sakaguchi K.; Agr. Biol. Chem. 1973, 37, (4), 719–724].

**[0009]** Peptidoglutaminasen sind zur Modifizierung von Nahrungsmittel-Proteinen bekannt und geeignet. Strukturelle Modifikationen von Proteinen verbessern ihre funktionellen Eigenschaften und weiten ihre Verwendung als Lebensmittelbestandteile aus. Daher beschreibt US 5,082,672 ein Verfahren zur Behandlung von Nahrungsmittel-Proteinen durch Deamidierung mit einer Peptidoglutaminase, wobei bei dem Verfahren die Löslichkeit, das Emulgieren und Aufschäumen und weitere funktionelle Eigenschaften von Sojaprotein verbessert werden. US 5,082,672 berichtet jedoch auch, dass die Fähigkeit der Peptidoglutaminase, intaktes Soja-Protein zu deamidieren, aufgrund seiner großen Molekülgröße und/oder einzigartigen Konformation beschränkt ist. Daher lehrt US 5,082,672 den anfänglichen Abbau des Substrats durch Hydrolyse mit Alcalase™, ein aus *Bacillus licheniformis* erhaltener unspezifisch wirkender Endo/Exopeptidase-Komplex und/oder durch Wärmebehandlung und stellt fest, dass die Wärmevor- und Wärmenachbehandlung des hydrolysierten Sojaproteins den größten Deamidierungsgrad bewirkte.

**[0010]** US 3,857,967 beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Nahrungsmitteln und Getränken mit einer Peptidoglutaminase, erhalten aus *Bacillus circulans*. Um den größten Deamidierungsgrad zu erhalten, lehrt US 3,857,976 auch den anfänglichen Abbau des proteinartigen Substrats durch die Verwendung unspezifisch wirkender Endo/Exopeptidasen.

**[0011]** Mimouni et al. [Mimouni B., Raymond J., Marie-Desnoyers AM., Azanza JL. & Ducastaing A.; Journal of Cereal Science, 1994, 21, 153–165] beschreiben eine Kombination aus Säure-Deamidierung und enzymatischer Hydrolyse zur Verbesserung der funktionellen Eigenschaften des Weizenglutens. Insbesondere beschreiben Mimouni et al. die Säure-Deamidierung in Kombination mit der Verwendung von unspezifisch wirkenden Endopeptidasen.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0012]** Es wurde nun gefunden, dass Proteinhydrolysate mit hervorragendem Aroma und Funktionalität erhalten werden können, indem das proteinartige Material der kombinierten Wirkung eines Deamidierungsverfahrens und der Wirkung eines spezifisch wirkenden proteolytischen Enzyms unterzogen wird.

**[0013]** Demnach stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Erhalt eines Hydrolysats, das mit freier Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichert ist, aus vegetabilem proteinartigem Substrat bereit, wobei das Verfahren die Schritte umfasst, wobei das Substrat mit einer Peptidoglutaminase oder einer Transglutaminase einer Deamidierung unterzogen und das Substrat der Aktivität eines spezifisch wirkenden proteolytischen Enzyms unterworfen wird.

**[0014]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zum Erhalt eines Hydrolysats, das mit Glutaminsäure angereichert ist, aus einem proteinartigem Substrat bereit, wobei das Verfahren die Schritte umfasst, wobei das Substrat der Einwirkung einer Peptidoglutaminase unterzogen und das Substrat der Einwirkung eines proteolytischen Enzyms, das bevorzugt Glutamyl-Peptid-Bindungen spaltet, unterworfen wird, gefolgt von der Einwirkung von einer oder mehreren unspezifisch wirkenden Endo- und/oder Exopeptidase-Enzymen.

#### Ausführliche Offenbarung der Erfindung

**[0015]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Erhalt eines Hydrolysats, das mit freier Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten aus proteinartigem Substrat vegetabilen Ursprungs angereichert ist, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- (i) Durchführung eines Deamidierungsverfahrens mit dem Substrat durch Unterziehen des Substrats der Wirkung einer Peptidoglutaminase oder einer Transglutaminase; und
- (ii) Unterziehen des Substrats der Wirkung eines spezifisch wirkenden proteolytischen Enzyms.

**[0016]** Durch das erfindungsgemäße Verfahren können Proteinhydrolysate mit hervorragendem Aroma und Funktionalität erhalten werden. Insbesondere können Proteinhydrolysate mit hervorragendem Aroma erhalten werden, da Glutaminsäure (Glu), gleich ob frei oder peptidgebunden, eine wichtige Rolle für das Aroma und die Schmeckhaftigkeit von Proteinhydrolysaten spielt. Durch das erfindungsgemäße Verfahren können jedoch auch Proteinhydrolysate mit verbesserter Funktionalität erhalten werden, insbesondere in Bezug auf verbes-

serte Löslichkeit, verbesserte emulgierende Eigenschaften, erhöhter Hydrolysegrad und verbesserte Schaumbildungseigenschaften.

#### Deamidierungsverfahren

**[0017]** Die Überführung von Amiden (Glutamin oder Asparagin) in geladene Säuren (Glutaminsäure oder Asparaginsäure) über die Freisetzung von Ammoniak ist als Deamidierung bekannt. Die Deamidierung kann als nicht-enzymatisches oder enzymatisches Deamidierungsverfahren stattfinden.

**[0018]** Bei der vorliegenden Erfindung wird die enzymatische Deamidierung durchgeführt, indem das Substrat der Wirkung einer Transglutaminase oder der Wirkung einer Peptidoglutaminase unterzogen wird.

#### Transglutaminasen

**[0019]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die Deamidierung als ein enzymatisches Deamidierungsverfahren durchgeführt, wobei das Substrat der Wirkung einer Transglutaminase unterzogen wird. Die Transglutaminase kann aus jeder zweckmäßigen Quelle stammen, einschließlich von denjenigen, die aus Säugern stammen, siehe z.B. JP 1050382 und JP 5023182, einschließlich des aktivierten Faktors XIII, siehe z.B. WO 93/15234; denjenigen, die aus Fischen stammen, siehe z.B. EP 555.649; und denjenigen, die aus Mikroorganismen stammen, siehe z.B. EP 379.606, WO 96/06931 und WO 98/22366.

**[0020]** Bei einer weiteren spezifischen Ausführungsform ist die Transglutaminase von einer Oomycete, einschließlich eines Stammes von *Phytophthora*, insbesondere *Phytophthora cactorum*, eines Stammes von *Pythium*, insbesondere *Pythium irregulare*, *Pythium* sp., *Pythium intermedium*, *Pythium ultimum*, und *Pythium perillium* (oder *P. perilocum*) abgeleitet.

**[0021]** Bei noch einer weiteren spezifischen Ausführungsform ist Transglutaminase bakteriellen Ursprungs und ist vorzugsweise von einem *Bacillus*-Stamm, insbesondere *Bacillus subtilis*, einem *Streptovorticillium*-Stamm, insbesondere *Streptovorticillium mobaraensis*, *Streptovorticillium griseocarneum*, *Streptovorticillium cinnamoneum*, und einem Stamm von *Streptomyces*, insbesondere *Streptomyces lydicus* abgeleitet.

**[0022]** Die Transglutaminase soll in wirksamen Mengen zum proteinartigen Substrat zugegeben werden. Die Transglutaminase kann in den Mengen, die zweckmäßigerweise bei einem Deamidierungsverfahren verwendet werden, zugefügt werden. Es wird derzeit davon ausgegangen, dass eine wirksame Menge Transglutaminase im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 5 % (Gew./Gew.) Enzymzubereitung bezüglich der Substratmenge, vorzugsweise im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 1 % (Gew./Gew.) Enzymzubereitung bezüglich der Substratmenge liegt.

**[0023]** Die enzymatische Behandlung (Inkubation) kann bei jeder zweckmäßigen Temperatur, bei der die Enzymzubereitung nicht inaktiviert wird, vorzugsweise in einem Bereich von etwa 20°C bis etwa 70°C liegen.

**[0024]** Gemäß gängiger Praxis kann die Enzymzubereitung zweckmäßigerweise inaktiviert werden, indem die Temperatur des Inkubationsgemischs auf eine Temperatur erhöht wird, bei der die Enzyme inaktiviert werden, zum Beispiel auf über etwa 70°C, oder auch durch die Erniedrigung des pH-Wertes des Inkubationsgemischs auf einen Wert, bei dem die Enzyme inaktiviert werden, z.B. unter etwa 4.0.

#### Peptidoglutaminasen

**[0025]** Die Deamidierung wird als enzymatisches Deamidierungsverfahren durchgeführt, wobei das Substrat der Wirkung einer Peptidoglutaminase unterzogen wird.

**[0026]** Bei einer spezielleren Ausführungsform kann die Peptidoglutaminase, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet wird, eine Peptidoglutaminase I (Peptidyl-Glutaminase; EC 3.5.1.43), oder eine Peptidoglutaminase II (Protein-Glutamin-Glutaminase; EC 3.5.1.44), oder jedes Gemisch hieraus sein. Die Peptidoglutaminase kann aus einem Stamm von *Aspergillus*, insbesondere aus einem Stamm von *Aspergillus japonicus*, einem Stamm von *Bacillus*, insbesondere einem Stamm von *Bacillus circulans*, einem Stamm von *Cryptococcus*, insbesondere einem Stamm von *Cryptococcus albidus*, oder einem Stamm von *Debaryomyces*, insbesondere einen Stamm von *Debaryomyces hansenii* stammen.

**[0027]** Die Peptidoglutaminase soll dem proteinartigen Substrat in wirksamen Mengen zugegeben werden.

Die Peptidoglutaminase kann in den Mengen, die zweckmäßigerweise bei Deamidierungsverfahren verwendet werden, zugefügt werden. Es wird derzeit davon ausgegangen, dass eine wirksame Menge von Peptidoglutaminase im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 100000 PGase-Einheiten pro 100 g Substrat, insbesondere im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 10000 PGase-Einheiten pro 100 g Substrat liegt.

**[0028]** Die enzymatische Behandlung (Inkubation) kann bei jeder zweckmäßigen Temperatur, bei der die Enzymzubereitung nicht inaktiviert wird, vorzugsweise im Bereich von etwa 20°C bis etwa 70°C stattfinden.

**[0029]** Gemäß gängiger Praxis kann die Enzymzubereitung zweckmäßigerweise inaktiviert werden, indem die Temperatur des Inkubationsgemisches auf eine Temperatur erhöht wird, bei der die Enzyme inaktiviert werden, z.B. auf über etwa 70°C, oder auch indem der pH-Wert des Inkubationsgemischs auf einen Wert erniedrigt wird, bei dem die Enzyme inaktiviert werden, z.B. unter etwa 4,0. Spezifisch wirkende proteolytische Enzyme Das erfindungsgemäße Verfahren umfasst den Schritt, wobei das Substrat der Einwirkung eines spezifisch wirkenden proteolytischen Enzyms unterzogen wird. Insbesondere kann das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine spezifisch wirkende Endopeptidase oder eine spezifisch wirkende Exopeptidase sein. Das spezifisch wirkende proteolytische Enzym kann jeden verfügbaren Ursprungs sein.

#### Endopeptidasen

**[0030]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Endopeptidase, wie

- (i) eine Glutamyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.19);
- (ii) eine Lysyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.50);
- (iii) eine Leucyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.57);
- (iv) eine Glycyl-Endopeptidase (EC 3.4.22.25);
- (v) eine Prolyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.26);
- (vi) Trypsin (EC 3.4.21.4) oder eine Trypsin-ähnliche (Lysin/Arginin-spezifische) Endopeptidase; oder
- (vii) eine Peptidyl-Asp-Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.33).

**[0031]** Die Glutamyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.19) von Punkt (i), d.h. ein proteolytisches Enzym, das bevorzugt Glutamoyl-Peptidbindungen spaltet, kann vorzugsweise von einem Stamm von Bacillus, insbesondere Bacillus licheniformis und Bacillus subtilis, einem Stamm von Staphylococcus, insbesondere Staphylococcus aureus, einem Stamm von Streptomyces, insbesondere Streptomyces thermovulgaris und Streptomyces griseus, oder von einem Stamm von Actinomyces sp. stammen.

**[0032]** Die Lysyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.50) von Punkt (ii) kann vorzugsweise von einem Stamm von Achromobacter, insbesondere Achromobacter lyticus, einem Stamm von Lysobacter, insbesondere Lysobacter enzymogenes, oder von einem Stamm von Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa stammen.

**[0033]** Die Leucyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.57) von Punkt (iii) kann pflanzlichen Ursprungs sein.

**[0034]** Die Glycyl-Endopeptidase (EC 3.4.22.25) von Punkt (iv) kann vorzugsweise von einer Papayapflanze (Carica Papaya) stammen.

**[0035]** Die Prolyl-Endopeptidase (EC 3.4.21.26) von Punkt (v) kann vorzugsweise von einem Stamm von Flavobacterium stammen, oder sie kann pflanzlichen Ursprungs sein.

**[0036]** Die Trypsin-ähnliche Endopeptidase von Punkt (vi) kann vorzugsweise von einem Stamm von Frisarium, insbesondere Fusarium oxysporum stammen, z.B. wie in WO 89/06270 oder WO 94/25583 beschrieben.

**[0037]** Die Peptidyl-Asp-Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.33) von Punkt (vii) kann vorzugsweise von einem Stamm von Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas fragi, stammen.

#### Exopeptidasen

**[0038]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym ein Exopeptidaseenzym, das von beiden Enden des Peptids wirken kann, d.h. es kann eine Aminopeptidase oder eine Carboxypeptidase sein.

**[0039]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Amino-

peptidase, wie

- (i) eine Leucylaminopeptidase (EC 3.4.11.1); oder
- (ii) eine Tripeptidaminopeptidase (EC 3.4.11.4).

**[0040]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Carboxypeptidase, wie

- (i) eine Prolincarboxypeptidase (EC 3.4.16.2);
- (ii) eine Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1);
- (iii) eine Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2);
- (iv) eine Carboxypeptidase C (EC 3.4.16.5);
- (v) eine Carboxypeptidase D (EC 3.4.16.6);
- (vi) eine Lysin(arginin)carboxypeptidase (EC 3.4.17.3);
- (vii) eine Glycincarboxypeptidase (EC 3.4.17.4);
- (viii) eine Alanincarboxypeptidase (EC 3.4.17.6);
- (ix) eine Glutamatcarboxypeptidase (EC 3.4.17.11);
- (x) eine Peptidyldipeptidase A (EC 3.4.15.1); oder
- (xi) eine Peptidyldipeptidase (EC 3.4.15.5).

**[0041]** Das spezifisch wirkende Endo- oder Exopeptidaseenzym soll dem proteinartigen Substrat in wirksamen Mengen zugegeben werden. Das proteolytische Enzym kann in Mengen zugegeben werden, die bei herkömmlichen Proteinhydrolyseverfahren verwendet werden. Es wird derzeit davon ausgegangen, dass eine wirksame Menge der Endopeptidase im Bereich von etwa 0,05 bis etwa 15 CPU/100 g Substrat, insbesondere im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 5 CPU/100 g Substrat liegt und eine wirksame Menge der Exopeptidase im Bereich von etwa 0,001 bis etwa 0,5 AU/100 g Substrat, insbesondere im Bereich von etwa 0,01 bis etwa 0,1 AU/100 g Substrat liegt.

**[0042]** Die enzymatische Behandlung (Inkubation) kann bei jeder zweckmäßigen Temperatur stattfinden, bei der die Enzymzubereitung nicht inaktiviert wird, vorzugsweise in einem Bereich von etwa 20°C bis etwa 70°C.

**[0043]** Gemäß gängiger Praxis kann die Enzymzubereitung zweckmäßigerweise inaktiviert werden, indem die Temperatur des Inkubationsgemischs auf eine Temperatur erhöht wird, bei der die Enzyme inaktiviert werden, z.B. bis über etwa 70°C, oder auch durch die Erniedrigung des pH-Werts des Inkubationsgemischs auf einem Wert, bei dem die Enzyme inaktiviert werden, z.B. unter etwa 4,0.

#### Unspezifisch wirkende proteolytische Enzyme

**[0044]** Bei einer spezielleren Ausführungsform umfasst das erfindungsgemäße Verfahren den zusätzlichen Schritt

- (iii) des Unterziehens des Substrats der Einwirkung einer oder mehrerer unspezifisch wirkender Endo- und/oder Exopeptidaseenzyme.

**[0045]** Bei diesem Schritt wird das Substrat einem herkömmlichen Hydrolyseschritt unterzogen. Dieser zusätzliche Schritt kann gleichzeitig mit den Schritten (i) und (ii) stattfinden oder kann im Anschluss an die Schritte (i) und (ii) durchgeführt werden. Insbesondere kann das Substrat das Reaktionsgemisch von Schritt (i) und (ii) sein.

**[0046]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform stammt das unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym von einem Stamm von Aspergillus, insbesondere von einem Stamm von Aspergillus niger, einem Stamm von Aspergillus oryzae, oder einem Stamm von Aspergillus soyae, oder einem Stamm von Bacillus, insbesondere einem Stamm von Bacillus amyloliquefaciens, einem Stamm von Bacillus lentus, einem Stamm von Bacillus licheniformis oder einem Stamm von Bacillus subtilis.

**[0047]** Das unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym wird dem Substrat in Mengen im Bereich von etwa 0,05 bis etwa 15 CPU/100 g Substrat, insbesondere im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 5 CPU/100 g Substrat zugefügt.

**[0048]** Die enzymatische Behandlung (Inkubation) kann bei jeder zweckmäßigen Temperatur, bei der die Enzymzubereitung nicht inaktiviert wird, stattfinden, vorzugsweise im Bereich von etwa 20°C bis etwa 70°C.

**[0049]** Gemäß gängiger Praxis kann die Enzymzubereitung zweckmäßigerweise inaktiviert werden, indem

die Temperatur des Reaktionsgemisches auf eine Temperatur erhöht wird, bei der die Enzyme inaktiviert werden, z.B. auf etwa über 70°C, oder auch durch Erniedrigung des pH-Werts des Inkubationsgemisches auf einen Wert, bei dem die Enzyme inaktiviert werden, z.B. unter etwa 4,0.

#### Proteinartige Substrate

**[0050]** Das proteinartige Substrat, das dem erfindungsgemäßen Verfahren unterzogen wird, kann aus intakten Proteinen bestehen, oder es kann aus vorhydrolysierten Proteinen (Peptiden) bestehen, oder es kann ein Gemisch davon sein.

**[0051]** Das proteinartige Substrat ist pflanzlichen Ursprungs und kann insbesondere Sojaprotein, Getreideprotein, z.B. Weizengluten, Maisgluten, Gerste-, Roggen-, Hafer-, Reis-, Zein-, Baumwollsamensemenprotein, Rapsamenprotein, Erdnuss-, Alfalfaprotein, Erbsenprotein, bohnenartiges Bohnenprotein, Sesamsamenprotein oder Sonnenblumenprotein sein.

#### Industrielle Anwendungsmöglichkeiten

**[0052]** Die an freier Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereicherten Hydrolysate, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten werden, können bei verschiedenen industriellen Anwendungen eingesetzt werden, insbesondere wobei es der Einarbeitung funktioneller Proteine bedarf.

**[0053]** Darum stellt bei einem weiteren Aspekt die vorliegende Erfindung ein Lebensmittelprodukt bereit, das ein an freier Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichertes Hydrolysat, das durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten wird, umfasst.

**[0054]** Bei noch einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung einen Tierfutter-Zusatzstoff bereit, der ein mit freier Glutaminsäure und/oder peptidgebundenen Glutaminsäureresten angereichertes Hydrolysat, das durch das erfindungsgemäße Verfahren erhalten wird, umfasst.

#### Enzymatischer Aktivitätstest

##### Peptidoglutaminaseaktivität

**[0055]** Die Peptidoglutaminaseaktivität kann gemäß dem Verfahren von Cedrangoro et al. [Cedrangoro et al.; Enzymologia 1965, 29 143] und wie in US 3,857,967 beschrieben bestimmt werden.

**[0056]** Nach diesem Verfahren werden 0,5 ml einer Enzymprobe, die mit 1 N NaOH auf pH 6,5 eingestellt ist, in einem kleinen Gefäß vorgelegt. Nach dem Verfahren von Cedrangoro et al. wird 1 ml Boratpufferlösung, pH 10,8, in das Gefäß gegeben, das abgegebene Ammoniak wird durch 5 N Schwefelsäure absorbiert, und eine Farbbildung des Gemisches durch die Verwendung von Nessler's Reagenz wird ermöglicht und die Lichtextinktion der gebildeten Farbe bei 420 nm gemessen.

**[0057]** 1 PGase-Einheit ist die Enzymmenge, bei der unter diesen Bedingungen 1 µmol/min Ammoniak gebildet wird.

**[0058]** Alternativ kann die Peptidoglutaminaseaktivität gemäß dem in Beispiel 2 beschriebenen Verfahren bestimmt werden.

#### Proteolytische Aktivität: Caseinproteaseeinheiten (CPU)

**[0059]** Die proteolytische Aktivität kann durch die Verwendung von Casein als Substrat bestimmt werden. Eine Casein-Proteaseeinheit (CPU) wird als die Enzymmenge definiert, die 1 mM der primären Aminogruppen (bestimmt durch Vergleich mit einem Serin-Standard) pro Minute unter Standardbedingungen freisetzt, d.h. Inkubation für 30 min bei 25°C und pH 9,5.

**[0060]** Ein Ordner AF 228/1, der dieses analytische Verfahren genauer beschreibt, ist auf Anfrage bei Novo Nordisk A/S, Dänemark, verfügbar, dessen Dokument hiermit als Referenz eingeschlossen wird.

## Proteolytische Aktivität: Anson-Einheiten (AU)

**[0061]** Die proteolytische Aktivität kann alternativ mit denaturiertem Hämoglobin als Substrat bestimmt werden. Bei dem Anson-Hämoglobin-Verfahren zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität wird denaturiertes Hämoglobin verdaut und das unverdaute Hämoglobin mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt. Die Menge an TCA-löslichem Produkt wird mit Phenolreagenz bestimmt, das mit Tyrosin und Tryptophan eine blaue Farbe ergibt.

**[0062]** 1 Anson-Einheit (AU) wird als die Enzymmenge definiert, wobei unter Standardbedingungen (d.h. 25°C, pH 7,5 und 10 min. Reaktionszeit) Hämoglobin mit einer Anfangsgeschwindigkeit verdaut wird, so dass eine Menge an TCA-löslichem Produkt pro Minute freigesetzt wird, welche mit Phenolreagenz die gleiche Farbe ergibt, wie 1 Milliäquivalent Tyrosin.

**[0063]** Ein Ordner AF 4/5, der das analytische Verfahren genauer beschreibt, ist auf Anfrage bei Novo Nordisk A/S, Dänemark, erhältlich, wobei der Ordner hiermit durch Bezugnahme eingeschlossen ist.

## Proteolytische Aktivität: Leucinaminopeptidase-Einheiten (LAPU)

**[0064]** Alternativ kann die proteolytische Aktivität mit Leucin-p-nitroanilid als Substrat bestimmt werden. Bei der Hydrolyse wird p-Nitroanilid freigesetzt und macht die Lösung gelb. Die Aktivität wird bestimmt, indem p-Nitroanilid als Chromophor verwendet und die gebildete gelbe Farbe bei 405 nm im Photometer gemessen wird.

**[0065]** 1 Leucinaminopeptidase-Einheit (LAPU) ist die Enzymmenge, die 1 µ(micro)M Substrat pro Minute unter folgenden Bedingungen zersetzt: 26 mM Leucin-p-nitroanilid als Substrat, 0,1 M Trispuffer (pH 8,0), 40°C, 10 min Reaktionszeit.

## BEISPIELE

**[0066]** Die Erfindung wird in den folgenden Beispielen weiter erläutert.

## Beispiel 1

## Erhöhte Proteinlöslichkeit und Freisetzung von Glutamat durch Deamidierung

## Hydrolyse

**[0067]** Weizengluten (WG) wurde von Cargill (JOB 5141) erhalten, und deamidiertes Weizengluten (DWG) wurde von StaPro Consultancy B. V., Lemdijk 32, 9422 TH Smilde, NL, erhalten. Suspensionen von 8 % Protein wurden hergestellt, indem 11 g Gluten mit 89 g Wasser gemischt wurden. Der p.H-Wert wurde mit NaOH auf 6,5 eingestellt. Den Suspensionen wurde Glutamat/Aspartatspezifische Protease (SP446), erhältlich wie in WO 91/13554 beschrieben, oder Lysin/Argininspezifische Protease (SP387), erhältlich wie in WO 89/06270 beschrieben, zugefügt. Die Dosierung betrug 0,01 AU/g Protein für SP446 und 0,006 AU/g Protein für SP387. Flavourzyme™ (eine unspezifisch wirkende Proteasezubereitung, erhältlich von Novo Nordisk A/S, Dänemark, die Endo- und Exopeptidaseaktivität enthält, und durch Fermentierung von *Aspergillus oryzae* erhalten wurde), wurde einigen der Hydrolysate in einer Dosis von 20 LAPU/g Protein zugefügt. Die Hydrolysen wurden bei 50°C ohne weitere pH-Einstellung für 18 h durchgeführt. Die Enzyme wurden durch Erhitzen auf 85°C für 15 min inaktiviert. Der pH-Wert wurde auf 5 eingestellt und die Hydrolysate zentrifugiert. Der Gehalt an Protein und freiem Glutamat im Überstand wurde bestimmt.

## Proteinbestimmung

**[0068]** Protein wurde durch Kjeldahl-Analyse unter Verwendung eines Kjeldahl-Faktor 6,25 bestimmt.

## Glutamatbestimmung

**[0069]** Die Gehalt an freiem Glutamat wurde unter Verwendung des Boehringer-Mannheim-Testsatzes zur Glutamatbestimmung (Katalog-Nr. 139 092) bestimmt. Das Verfahren wurde der Verwendung auf Mikrotiterplatten angepasst.

## Ergebnisse

| Hydrolysat             | Protein-Löslichkeit |     | Glutamat-Gehalt |      |
|------------------------|---------------------|-----|-----------------|------|
|                        | %                   |     | mg/l            |      |
|                        | WG                  | DWG | WG              | DWG  |
| SP446                  | 18                  | 54  | 0               | 0    |
| SP387                  | 35                  | 44  | 0               | 0    |
| SP446+<br>Flavourzyme™ | 34                  | 87  | 1000            | 2000 |

**[0070]** Beim Vergleich von Weizengluten (WG) mit deamidiertem Weizengluten (DWG) zeigen die Ergebnisse, dass die Deamidierung die Suszeptibilität von Gluten gegenüber spezifischen Proteasen erhöht, so dass mehr Protein löslich wird. Bei Zugabe von Flavourzyme™, zusätzlich zu einer spezifischen Protease, wird die Freisetzung von Glutamat aufgrund von Deamidierung verdoppelt.

## Beispiel 2

## Enzymatische Deamidierung und Freisetzung von Glutamat

Fermentierung von *Bacillus circulans*

**[0071]** *Bacillus circulans*-Kulturen des Stammes ATCC 21590 wurden in Schüttelkolben mit 400 ml Fassungsvermögen gezüchtet, die 200 ml eines Mediums enthielten, bestehend aus 1 % Polypepton; 0,5 % Lactose; 0,025 %  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,005 %  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,025 %  $KH_2PO_4$  und 17 %  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ , wobei der pH-Wert auf 7,2 eingestellt war. Die Fermentation erfolgte 20 h bei 30°C unter Verwendung eines Rührers mit 270 U/min. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 U/min in 1-1-Kolben geerntet. Die Zellen wurden eingefroren.

Reinigung von Peptidoglutaminase II aus *Bacillus circulans*

**[0072]** Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

**[0073]** Die gefrorenen *Bacillus circulans*-Zellen wurden aufgetaut und in Lysepuffer (50 mM Tris/HCl; 25 % (Gew./Vol.) Saccharose; 1 mM EDTA, pH 8,0) suspendiert, bis eine homogene Suspension erhalten wurde – 100 g nasse Zellen pro Liter Lysepuffer. Lysozym™ (Fluka 62971, 10 mg/ml) und DNase I (Sigma DN-25, 10 mg/ml) wurden in Lysepuffer gelöst. 100 ml Lysozym™-Lösung, 10 ml 1,0 M  $MgCl_2$  und 1 ml DNase-I-Lösung wurden pro Liter Zensuspension zugefügt. Die Enzyme wurde 1 h einwirken gelassen.

**[0074]** Die Suspension wurde über ein Seitz-Tiefenfilter filtriert und das Filtrat in 10 mM  $KH_2PO_4/NaOH$ , pH 8,0 (Puffer A) auf eine Sephadex G25-Säule (Pharmacia) übergeführt. Die Enzymlösung wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte SOURCE-Q-Säule (Pharmacia) aufgetragen und mit einem linearen Natriumchloridgradienten (0 → 500 mM) in Puffer A eluiert. Die Fraktionen der Säule wurden wie unten beschrieben auf die Peptidoglutaminase-II-Aktivität analysiert und Fraktionen mit Aktivität vereinigt. Die Extinktion der vereinigten Fraktionen bei 280 nm betrug 1,78, also wurde der Proteingehalt auf 1,8 mg/ml geschätzt.

**[0075]** Die Reinheit des Proteins in dem Peptidoglutaminase-II-Pool war ungefähr 25 %, wie durch ein SDS-PAGE-Gel geschätzt wurde. Daher enthielt die Zubereitung etwa 0,5 mg/ml reine Peptidoglutaminase II.

## Peptidoglutaminase-Testverfahren

**[0076]** Die enzymatische Aktivität wird bestimmt, indem das bei der Hydrolyse von  $\gamma$ -Carboxyamid von N-tert-Butoxycarbonyl (N-t-BOC-Gln-Pro; SIGMA Nr. B-4403) gebildete Ammoniak unter Verwendung des Boehringer-Mannheim-Testsatzes zur Ammoniakbestimmung (Katalog-Nr. 1112732) gemessen wird. In diesem Testsatz wird Ammoniak gemessen, indem der NADH-Verbrauch durch Glutamatdehydrogenase bestimmt wird und auch Leerproben ohne den Zusatz von N-t-BOC-Gln-Pro verwendet werden, um die Wirkung der an-

deren NADH-verbrauchenden Enzyme zu substrahieren.

#### Weizengluten-Hydrolyse

**[0077]** 200 mg Weizenglutenprotein wurden 9 ml kochendem Wasser zugefügt, und nach Abkühlung wurde der pH auf 7,0 eingestellt. Dann wurden 250 µl der Peptidoglutaminase-II-Zubereitung (PEP), oben beschrieben, zugefügt. Die Glutamat/Aspartat-spezifische Protease (SP446) aus Beispiel 1 wurde in einer Menge von 0,04 AU/g Protein zugefügt, und Flavourzyme™ aus Beispiel 1 wurde in einer Menge von 20 LAPU/g Protein zugefügt.

**[0078]** Die Hydrolyse verlief 18 h ohne pH-Einstellung bei 50°C. Leerproben wurden ohne die Zugabe von Peptidoglutaminase hergestellt. Die Hydrolysate wurden zentrifugiert, und Glutamat wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben, gemessen.

**[0079]** Der Hydrolysegrad (DH) des Weizenglutenproteins wurde wie unten beschrieben bestimmt.

#### Bestimmung des Hydrolysegrades (DH)

**[0080]** Der DH des Proteins, definiert wie von Adler-Nissen [Adler-Nissen J; Enzymic Hydrolyse of Food Proteins; Elsevier Applied Science Publishers, 1986] beschrieben, wurde durch die Reaktion des Überstandes mit OPA (ortho-Phthaldialdehyd, Sigma) bestimmt. Für das OPA-Reagenz wurden 160 mg OPA in 4 ml Ethanol gelöst und in einen 200-ml-Messkolben übergeführt, der eine Lösung von 7,62 g Dinatriumtetraboratdecahydrat und 200 mg Natriumdodecylsulphat und 176 mg Dithiothreitol enthielt, und der Kolben wurde bis zur Markierung mit Wasser aufgefüllt. Das Reagenz ist lichtempfindlich.

**[0081]** 25 µl des zweckmäßigerweise verdünnten Überstandes wurden mit 200 µl OPA-Reagenz in einem Mikrotiterplattengefäß vermischt und eine Reaktion für genau 2 min bei 25°C ermöglicht. Die Extinktion bei 340 nm wurde in einem Mikrotiterplattenleser gemessen und mit der Extinktion einer 95 mM L-Serin-Standardlösung nach Abzug des Leerwertes (Wasser, das mit OPA-Reagenz reagiert hat), verglichen. Zur Feststellung des wahren DH, wurden die gemessenen Serin-Äquivalente in den Überständen mit den Faktoren korrigiert, die von Adler-Nissen für das Trinitrobenzolsulfonsäure-Verfahren vorgeschlagen wurden [Adler-Nissen J; Agricultural and Food Chemistry, 1979 27 (6), 1256], was zu der gleichen Reaktion wie bei der beschriebenen OPA-Methode führt. Der Hydrolysegrad wurde auf Basis der Gesamtproteinmenge in dem Hydrolysegemisch berechnet (nicht auf der Basis von löslichem Protein).

#### Ergebnisse

| Hydrolysat | DH<br>% | Glutamat<br>mg/ml |
|------------|---------|-------------------|
| minus PEP  | 40      | 131               |
| plus PEP   | 43      | 171               |

**[0082]** Wie von der Tabelle ersichtlich ist, erhöht die Hydrolyse mit der Peptidoglutaminase-Zubereitung den DH sowie die Freisetzung von Glutamat.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zum Erhalt eines Hydrolysats, das an freier Glutaminsäure und/oder an Peptid-gebundenen Glutaminsäure-Resten angereichert ist, aus einer proteinartigen Substanz vegetabilen Ursprungs, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- (i) Durchführung eines Deaminierungsverfahrens mit dem Substrat durch Unterziehen des Substrats der Wirkung einer Peptidoglutaminase oder einer Transglutaminase; und
- (ii) Unterziehen des Substrats der Wirkung eines spezifisch wirkenden proteolytischen Enzyms.

2. Verfahren nach Anspruche 1, wobei die Glutaminase aus einer Oomycete stammt, einschließlich eines Stamms von Phytophthora, insbesondere Phytophthora cactorum, eines Stamms von Pythium, insbesondere Pythium irregulare, Pythium sp., Pythium intermedium, Pythium ultimum und Pythium periillum (oder Pythium

periplocum).

3. Verfahren nach Anspruche 1, wobei die Glutaminase bakteriellen Ursprungs ist und vorzugsweise aus einem Stamm von Bacillus, insbesondere Bacillus subtilis, einem Stamm von Streptovercillium, insbesondere Streptovercillium mobaraensis, Streptovercillium griseocameum und Streptovercillium cinnamoneum, und einem Stamm von Streptomyces, insbesondere Streptomyces lydicus stammt.

4. Verfahren nach Anspruche 1, wobei die Peptidoglutaminase eine Peptidoglutaminase I (Peptidylglutaminase; EC 3.5.1.43) oder eine Peptidoglutaminase II (Protein-Glutaminglutaminase; EC 3.5.1.44) oder ein Gemisch davon ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 4, wobei die Peptidoglutaminase aus einem Stamm von Aspergillus, insbesondere einem Stamm von Aspergillus, japonicus, einem Stamm von Bacillus, insbesondere einem Stamm von Bacillus circulans, einem Stamm von Cryptococcus, insbesondere einem Stamm von Cryptococcus albidus oder einem Stamm von Debaryomyces, insbesondere einem Stamm von Debaryomyces klöckeri stammt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1, 4 und 5, wobei die Peptidoglutaminase dem Substrat in Mengen im Bereich von 0,01 bis 100.000 PGase-Einheiten pro 100 g Substrat, insbesondere im Bereich von 0,1 bis 10.000 PGase-Einheiten pro 100 g Substrat zugesetzt wird.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das spezifisch wirkende proteolytische Enzym eine Endopeptidase ist, wie

- (i) eine Glutamylendopeptidase (EC 3.4.21.19);
- (ii) eine Lysylendopeptidase (EC 3.4.21.50);
- (iii) eine Leucylendopeptidase (EC 3.4.21.57);
- (iv) eine Glycylendopeptidase (EC 3.4.22.25);
- (v) eine Prolylendopeptidase (EC 3.4.21.26);
- (vi) Trypsin (EC 3.4.21.4); oder
- (vii) eine Peptidyl-Asp-Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.33).

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Glutamylendopeptidase von (i) aus einem Stamm von Bacillus, insbesondere Bacillus licheniformis und Bacillus subtilis, einem Stamm von Staphylococcus, insbesondere Staphylococcus aureus, einem Stamm von Streptomyces, insbesondere Streptomyces thermovulgaris und Streptomyces griseus oder einem Stamm von Actinomyces sp. stammt.

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Lysylendopeptidase von (ii) aus einem Stamm von Achromobacter, insbesondere Achromobacter lyticus, einem Stamm von Lysobacter, insbesondere Lysobacter enzymogenes, oder einem Stamm von Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas aeruginosa stammt.

10. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Glycylendopeptidase aus (iv) aus der Papayapflanze (Carica Papaya) stammt.

11. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Prolylendopeptidase aus (v) aus einem Stamm von Flavobacterium stammt.

12. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Peptidyl-Asp-Metalloendopeptidase (EC 3.4.24.33) von (vii) aus einem Stamm von Pseudomonas, insbesondere Pseudomonas fragi stammt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das spezifisch wirkende proteolytische Enzym ein Exopeptidaseenzym ist.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Exopeptidase eine Aminopeptidase ist, wie

- (i) eine Leucylaminopeptidase (EC 3.4.11.1); oder
- (ii) eine Tripeptidaminopeptidase (EC 3.4.11.4).

15. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Exopeptidase eine Carboxypeptidase ist, wie

- (i) eine Prolincarboxypeptidase (EC 3.4.16.2);
- (ii) eine Carboxypeptidase A (EC 3.4.17.1);
- (iii) eine Carboxypeptidase B (EC 3.4.17.2);

- (iv) eine Carboxypeptidase C (EC 3.4.16.5);
- (v) eine Carboxypeptidase D (EC 3.4.16.6);
- (vi) eine Lysin(Arginin)carboxypeptidase (EC 3.4.17.3);
- (vii) eine Glycincarboxypeptidase (EC 3.4.17.4);
- (viii) eine Alanincarboxypeptidase (EC 3.4.17.6);
- (ix) eine Glutamatcarboxypeptidase (EC 3.4.17.11);
- (x) eine Peptidyl-dipeptidase A (EC 3.4.15.1); oder
- (xi) eine Peptidyl-dipeptidase (EC 3.4.15.5) ist.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 zum Erhalt eines Hydrolysats, das an Glutaminsäure angereichert ist, aus einem proteinartigen Substrat, wobei das Verfahren die Schritte umfasst:

- (i) Unterziehen des Substrats der Wirkung einer Peptidoglutaminase; und
- (ii) Unterziehen des Substrats der Wirkung eines proteolytischen Enzyms, das vorzugsweise Glutamoyl-Peptidbindungen spaltet (d.h. eine Glutamylendopeptidase; EC 3.4.21.19).

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–16, wobei das spezifisch wirkende proteolytische Enzym dem Substrat in Mengen im Bereich von 0,05 bis 15 CPU/100 g Substrat, insbesondere im Bereich von 0,1 bis 5 CPU/100 g Substrat zugesetzt wird.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–17, wobei Schritt (i) und (ii) von Anspruch 1 gleichzeitig durchgeführt werden.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–17, wobei Schritt (ii) von Anspruch 1 im Anschluss an Schritt (i) von Anspruch 1 durchgeführt wird.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–19, wobei das Verfahren den zusätzlichen Schritt umfasst (iii) Unterziehen des Substrats der Wirkung von einer oder mehreren unspezifisch wirkenden Endo- und/oder Exopeptidaseenzymen.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Schritte (i), (ii) und (iii) gleichzeitig durchgeführt werden.

22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei Schritt (iii) nach den Schritten (i)–(ii) durchgeführt wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20–22, wobei das unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym von Schritt (iii) aus einem Stämmen von *Aspergillus*, insbesondere einem Stamm von *Aspergillus niger*, einem Stamm von *Aspergillus oryzae*, oder einem Stamm von *Aspergillus soyae* oder einem Stamm von *Bacillus*, insbesondere einem Stamm von *Bacillus amyloliquefaciens*, einem Stamm von *Bacillus Lentus*, einem Stamm von *Bacillus licheniformis* oder einem Stamm von *Bacillus subtilis* stammt.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20–23, wobei das unspezifisch wirkende Endo- und/oder Exopeptidaseenzym dem Substrat in Mengen im Bereich von 0,05 bis 15 CPU/100 g Substrat, insbesondere im Bereich von 0,1 bis 5 CPU/100 g Substrat oder in Mengen im Bereich von 0,001 bis 0,5 AU/100 g Substrat, insbesondere im Bereich von 0,01 bis 0,1 AU/100 g Substrat zugesetzt wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–24, wobei das proteinartige Substrat vegetabilen Ursprungs Sojaprotein, Getreideprotein, z.B. Weizengluten, Maisgluten, Gerste-, Roggen-, Hafer-, Reis-, Zein-, Baumwollsamenseiweiß, Rapssamenseiweiß, Erdnuss-, Alfalfaprotein, Erbsenprotein, bohnenartiges Bohnenprotein, Sesamsamenseiweiß oder Sonnenblumenseiweiß ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen