

19



Octrooiraad
Nederland

11 194258

12 C OCTROOI

21 Aanvraag om octrooi: 9001882

51 Int.Cl.⁷
A23J1/14

22 Ingediend: 28.08.1990

30 Voorrang:
01.09.1989 US 0000402340

43 Ter inzage gelegd:
02.04.1991 I.E. 1991/07

44 Openbaargemaakt:
02.07.2001 I.E. 2001/07

47 Dagtekening:
05.11.2001

45 Uitgegeven:
02.01.2002 I.E. 2002/01

73 Octrooihouder(s):
Protein Technologies International Inc. te St.
Louis, Missouri, Verenigde Staten van Amerika
(US).

74 Gemachtigde:
Ir. J.J.H. Van kan c.s. te 5600 AP Eindhoven.

54 Werkwijze voor het behandelen van een eiwithoudend materiaal.

Werkwijze voor het behandelen van een eiwithoudend materiaal

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het behandelen van een eiwitmateriaal door een waterige suspensie van het eiwitmateriaal bij een pH-waarde van meer dan 7 te onderwerpen aan de werking van een proteolytisch enzym, zonder in het behandelende eiwit een bittere smaak teweeg te brengen.

Een dergelijke werkwijze is bekend uit FR 2.338.001. Volgens de bekende werkwijze worden weliswaar producten verkregen die geen zeer bittere smaak hebben, maar wordt het probleem van het verkrijgen van zowel een aanzienlijk verhoogde oplosbaarheid als een verbetering van de functionele eigenschappen van de betrokken eiwitten echter niet opgelost. Uit onderzoek van aanvraagster blijkt dat het eiwitsubstraat onder toepassing van de uit FR 2.338.001 bekende werkwijze niet gelijkmatig en volledig, dit wil zeggen met inbegrip van de hydrofobe kern, wordt behandeld en aangetast.

Een verhoogde oplosbaarheid en een verhoging van de functionele eigenschappen van de eiwitten van het eiwitmateriaal worden verkregen onder toepassing van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding, die is gekenmerkt doordat een eiwitmateriaal dat een onoplosbare fractie bevat, wordt behandeld door de pH-waarde op 9 of hoger te brengen, het proteolytische enzym toe te voegen, en de suspensie vervolgens te doen reageren gedurende een tijd en bij een temperatuur die in combinatie met de pH-waarde en het enzym zodanig zijn dat het eiwit gedeeltelijk wordt gehydrolyseerd en gedeeltelijk wordt gedeamideerd, welke behandeling effectief is om in hoofdzaak gelijkmatig over nagenoeg het gehele eiwitsubstraat, met inbegrip van de onoplosbare fractie van het eiwitsubstraat, te hydrolyseren en te deamideren, welke gecontroleerde hydrolyse en deamidering effectief zijn om de oplosbaarheid van het eiwit aanzienlijk te verhogen en de functionele eigenschappen van het eiwit te verhogen.

Onder toepassing van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding worden globulaire eiwitten als gevolg van ladingsafstotingen in de secundaire en tertiaire eiwitstructuur tot ontvouwing gebracht. Dit voordeel wordt verkregen door het toepassen van een pH-waarde van 9 of meer. Hierbij wordt ook de hydrofobe kern van eiwitmateriaal blootgesteld. Bovendien wordt onder toepassing van een pH-waarde van 9 of meer niet alleen een hydrolyse van peptidebindingen, maar ook een deamidering verkregen. De deamiderende activiteit is kritisch afhankelijk van de pH-waarde. De voordelen van de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding, met name een oplosbaarheid die nagenoeg 100% kan bedragen en verrassend betere eigenschappen van het eindproduct, wordt verkregen door de gecombineerde hydrolytische en deamiderende activiteit van het volledige substraat, met inbegrip van de hydrofobe kern daarvan.

Uit JP-A-63.036.797 is een werkwijze voor het modificeren van een eiwit bekend, waarbij een eiwit onder toepassing van een protease onder zodanige omstandigheden wordt behandeld dat deamidering zonder hydrolyse plaatsvindt. De deamidering wordt bij basische pH-waarden uitgevoerd, maar het volgens de onderhavige uitvinding onderkende en opgeloste probleem van het verkrijgen van oplosbaarheid die tot 100% kan bedragen door in het bijzonder een pH-waarde van 9 of meer toe te passen, is niet bekend uit JP-A-63.036.797. Dat het verkregen eiwitmateriaal bedoeld voor menselijke consumptie geen bittere smaak mag hebben, is in JP-A-63.036.797 niet onderkend.

In U.S. Patent 4.824.940 is een werkwijze voor het deamideren van oliezaadeiwit beschreven, waarbij geen proteolytisch enzym wordt toegepast.

Uit U.S. Patent 4.757.007 is een werkwijze voor het hydrolyseren van soja-eiwit onder toepassing van een protease bekend. De hydrolyse wordt uitgevoerd onder zure omstandigheden.

Volgens de onderhavige uitvinding worden bijzonder goede resultaten verkregen wanneer de pH-waarde van de suspensie wordt ingesteld tussen 9 en 11, en het verdient in het bijzonder de voorkeur dat de pH-waarde wordt ingesteld op ongeveer 10. Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm wordt de pH-waarde van de suspensie daarom ingesteld tussen 9 en 11. Volgens een andere voorkeursuitvoeringsvorm wordt de behandelde suspensie in reactie gebracht bij een temperatuur tussen 10°C en 75°C. Deze en andere de voorkeur verdienende aspecten van de onderhavige uitvinding blijken uit de verdere beschrijving en uit de voorbeelden.

De onderhavige uitvinding is in hoofdzaak gericht op het verwerken van materialen op basis van sojabonen, omdat met name deze uitgangsmaterialen problemen in verband met oplosbaarheid een bittere smaak kunnen opleveren. Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm is dan ook het eindmateriaal een afgescheiden soja-eiwit. Daarom zal de onderhavige uitvinding voornamelijk worden toegelicht onder verwijzing naar sojabonenmateriaal, alhoewel de werkwijze ook kan worden toegepast voor andere eiwithoudende materialen, zoals andere plantaardige of oliezaadhoudende materialen, materialen op basis van visewit, of microbiële eiwithoudende producten.

Bij de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding, die overigens half-continu of batch-gewijs kan

worden toegepast, wordt bij een enzymatische reactie een geregelde pH-waarde toegepast om het te reageren eiwit gedeeltelijk te hydrolyseren en te deamideren, op zodanige wijze dat het eiwit op de gewenste wijze wordt gemodificeerd. De bekende werkwijzen hebben niet geleid tot producten met oplosbaarheden van meer dan 50% tot 60% van het beschikbare eiwit, omdat de eiwitkernen nagenoeg niet worden aangetast door de enzymatische werking. Pogingen om de oplosbaarheid van de betrokken eiwitproducten te verhogen door de omstandigheden van de behandeling te verzwaren, hebben niet geleid tot een verhoogde oplosbaarheid, maar integendeel tot een achteruitgang van de nutritionele en andere functionele eigenschappen van de betrokken eiwitten. Een belangrijke doelstelling volgens de onderhavige uitvinding is het verkrijgen van een enzymatische werkwijze voor het bewerken van plantaardig eiwit en met name eiwitmaterialen van sojabonen ter vorming van een eiwitproduct dat op gewenste wijze verteerbaar is, met een hoge oplosbaarheid, die noodzakelijk is om het product functioneel te doen zijn en met een voortreffelijke werking wat betreft de schuimvorming en de vorming van een emulsie.

Een andere doelstelling is het verkrijgen van een dergelijk product dat zeer sterk functioneel is door de gecontroleerde hoge oplosbaarheid, waardoor waterige suspensies worden verkregen met een voortreffelijke zuiverheid, die een voortreffelijke gelijkmatige textuur hebben, niet kalkachtig van smaak zijn en geen klonters vormen of korrelvormig zijn.

Een verdere doelstelling is, een product te bereiden dat direct als voedingsmiddel kan worden gebruikt en ook gelijkmatig kan worden gemengd met producten die andere smaakstoffen bevatten zonder het karakter van de andere smaakstoffen te veranderen.

Het nieuwe product dat wordt verkregen heeft een voortreffelijke werking en buitengewone oplosbaarheid. Het wordt verkregen via een werkwijze die gebruik maakt van verwarmen, regeling van de pH en enzymatische hydrolyse. Het product heeft een optimale combinatie van eigenschappen die tot nu toe niet werden verkregen, te weten een hoge oplosbaarheid boven 50-60% en tot ongeveer 100% voor een product gevormd uit een afgescheiden eiwit. Het kan zodoende worden gebruikt als een voedingsproduct in verschillende vormen met een hoog eiwitgehalte. Het kan selectief worden toegevoegd aan een ruim aantal andere voedingsproducten om speciale resultaten te verkrijgen, zoals middelen ter versterking van het eiwit die worden toegevoegd aan waterige oplossingen door de consument. Wanneer ze worden toegevoegd aan koude melk, vertoont het materiaal volgens de uitvinding voortreffelijke oplosbaarheidskarakteristieken van ongeveer 100%. Het aanvoelen in de mond en de smaak van het melkmengsel is voortreffelijk en kan een verfrissende en voedzame drank geven, zoals om te worden toegepast als instant-ontbijt.

De onderhavige werkwijze geeft de voorkeur een behandeling van eiwitmateriaal in de vorm van een waterige suspensie met een gecontroleerde, verhoogde pH-waarde en een behandeling met enzymen bij een verhoogde temperatuur. De gekozen pH-waarde in samenhang met het enzym doet het volledige eiwithoudende substraat beschikbaar zijn voor de hydrolyse door enzymen en deamidering, met inbegrip van de eiwitten in de kern die in het substraat aanwezig zijn. Door een zorgvuldige regeling van de werkwijze kunnen de oplosbaarheidsgraad en deamidering van het verkregen product beide binnen een zeer ruim gebied worden geregeld. De omstandigheden van de pH-waarde en temperatuur worden gekozen om de vorming van LAL-verbindingen te voorkomen, zodat deze bijvoorbeeld lager zijn dan ongeveer 300 dpm.

De acceptatie van plantaardige eiwitten zoals sojabonen, aardnoten, saffraanmeel, katoenzaden, sesamzaden, zaden van zonnebloemen en dergelijke hangt af van de modificatie van deze materialen om de functionele eigenschappen hiervan te verbeteren. Intensief onderzoek is uitgevoerd met betrekking tot deze uitgangsstoffen teneinde geschikte voedingsproducten te ontwikkelen. Als resultaat hiervan zijn enkele van deze materialen nu bewerkt om voedingsproducten te bereiden die in zijn algemeenheid worden aangegeven als verteerbare plantaardige eiwitten. De functionele eigenschappen hiervan, zoals de smaak en oplosbaarheid en de eigenschappen met betrekking tot de vorming van schuim en het doen ontstaan van een emulsie van deze materialen is echter niet voldoende voor toepassingen voor veel voedingsmiddelen op grote schaal. Volgens de onderhavige werkwijze is een nieuw eiwithoudend materiaal bereid met een sterk verbeterde oplosbaarheid, zonder dat een product wordt verkregen met een bittere smaak. De oplosbaarheid kan hoog zijn en zelfs 100%. Dit resultaat is verkregen door een enzymatische hydrolyse en gedeeltelijke deamidering van nagenoeg het volledige eiwithoudende substraat. Het niveau van deamidering kan worden gevarieerd tussen 5% en 48%. Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm wordt het eiwit daarom gedeamideerd tot tussen 5% en 48%. De hydrolyse wordt uitgevoerd onder omgevingsomstandigheden tot verhoogde temperatuur en onder een geregelde, verhoogde pH-waarde, die effectief is om het eiwithoudende substraat oplosbaar te maken zonder een afbraak of overmatige hydrolyse van het eiwithoudende substraat en in het bijzonder zonder dat een overmatige hydrolyse of afbraak optreedt van de fractie van het substraat die niet de kern hiervan vormt. Bovendien wordt de oplosbaarheid van het onderhavige product

verbreed, zodat een ruimer pH-gebied kan worden toegepast. Wanneer de hydrolyse is voortgezet tot een gewenste toestand, kan de reactie worden gestopt door het enzym te inactiveren, bijvoorbeeld door verwarmen. De omstandigheden van de werkwijze worden gecontroleerd en de vorming van ongewenste LAL-verbinding te minimaliseren of te voorkomen, in het bijzonder door het handhaven van de pH-waarde van de reactie beneden 12.

De pH-waarde van de werkwijze wordt geregeld tussen 9 en 11 tijdens de werkwijze. Deze grenzen zijn effectief gebleken. Een pH-waarde van 10 is met name effectief gebleken, zoals in de inleiding reeds gesteld is. De regeling van de pH-waarde kan plaatshebben door het gebruik van conventionele basen en buffers die normaal worden toegepast bij voedingsmiddelen, zoals natriumhydroxide, natriumbicarbonaat ammoniumcarbonaat, natriumtripolyfosfaten, zoutzuur en andere conventionele chemicaliën. De optimale pH-waarde kan enigszins verschillend zijn voor elk bepaald toegepast enzym, maar de werkwijze is effectief binnen dit pH-gebied. De temperatuur van de reactie kan variëren van ongeveer 10°C, kamertemperatuur tot ongeveer 75°C, maar de werkwijze is in het algemeen effectief binnen dit pH-gebied. De optimale temperatuursomstandigheden kunnen enigszins variëren binnen dit gebied voor elk bepaald systeem. Op dezelfde wijze kan de reactietijd variëren binnen een effectief gebied van ongeveer 10 minuten tot 4 uren en kan verschillende optimale waarden hebben voor een bepaald systeem van tijd, temperatuur, pH en bepaald enzym binnen het effectieve gebied.

De enzymen die werkzaam zijn bij de onderhavige werkwijze zijn in het algemeen proteolytische enzymen die kunnen worden verkregen uit dierlijke, plantaardige en microbiële uitgangsstoffen. Een aantal enzymen is effectief gebleken. Deze omvatten papaïne, trypsine, ficine en een aantal bacteriële en fungale proteasen. De enige beperking ten aanzien van het protease is dat het stabiel moet zijn en niet moet worden geïnactiveerd door de pH-waarde die bij deze werkwijze wordt toegepast.

Het enzymmateriaal kan worden toegepast in een bij voorkeur toegepaste hoeveelheid van ongeveer 0,01 tot 5,0 gew.% van het eiwithoudende materiaal (droge basis) afhankelijk van de temperatuur en de toegepaste tijdsduur, de activiteit van de enzymen en de gewenste hydrolysegraad. Volgens een voorkeurs-uitvoeringsvorm wordt het enzym daarom toegevoegd op een niveau van 0,01 gew.% tot 5 gew.% gebaseerd op het droge gewicht van het eiwit in de suspensie. De enzymactiviteit kan worden gedefinieerd als de hoeveelheid enzym die nodig is om een standaardhoeveelheid tyrosine te bereiden uit caseïne en maltose uit zetmeel onder standaardomstandigheden. Het enzymgehalte boven 1,0% kan worden toegepast, maar de kosten kunnen onevenredig worden voor enkele enzymmaterialen. Bij een gehalte beneden 0,05% kan de enzymatische reactie te langzaam plaatshebben met enkele enzymsystemen.

De behandelde eiwithoudende suspensie en het materiaal voor het enzym worden met name in reactie gebracht in een opvangvat ter verkrijging van een voldoende tijdsduur voor de reactie, om deze tot nagenoeg volledig te doen plaatshebben. Wanneer de enzymatische reactie gedurende een voldoende tijdsduur heeft plaatsgehad, wordt de reactie gestopt bijvoorbeeld door verwarmen van de suspensie tot een temperatuur die voldoende is om de enzymen te inactiveren. Temperaturen boven 82°C zijn voldoende om de enzymactiviteit te inactiveren. De verwarmingsstap kan worden uitgevoerd door het gereageerde materiaal door een warmtewisselaar te voeren, een kookbewerking onder spuiten uit te voeren of door de meest conventionele warmtebehandeling te verrichten. Na het inactiveren kan de pH-waarde van het product worden ingesteld op een gewenst niveau of de pH-waarde kan worden ingesteld voordat het inactiveren plaats heeft.

Het verkregen suspensievormige product kan direct worden toegepast voor voedingsmiddelen. Het is een attractief, licht gekleurd product. Anderzijds kan het worden gedroogd, waarbij het gedroogde product een voortreffelijke oplosbaarheid heeft in een waterig mengsel.

Indien de suspensie wordt gedroogd, wordt deze bij voorkeur snel gedroogd, ter verkrijging van een gelijkmatig fijn, poedervormig product, zodat een economisch uitvoerbare continue werkwijze mogelijk is en de voortreffelijke oplosbaarheidskarakteristieken van het poeder worden verkregen. Van deze snelle droogtechnieken wordt gewoonlijk sproeidrogen toegepast. Het product kan worden gevriesdroogd, maar dit is kostbaarder. Het gedroogde poeder is in staat tot een snelle eenvoudige rehydratie tot een suspensie door water toe te voegen en het mengsel te roeren, hetgeen mogelijk is door de hoge oplosbaarheid. Het product kan worden toegepast als een vervangingsmiddel voor derivaten van zuivelproducten, zelfs gedroogde afgeroomde melk, voor verschillende doeleinden. Het product heeft een voortreffelijke gelijkmatige textuur en smaak. Het product blijft in oplossing en bezinkt niet zodat geen bezinksel op de bodem van de houder ontstaat wanneer het wordt gemengd in een waterige suspensie.

De uitvinding zal nader worden toegelicht aan de hand van de volgende voorbeelden.

Voorbeeld I

- Een waterig stremsel van 390 kg afgescheiden soja-eiwit met een vaste stofgehalte van 14 gew.% werd behandeld door het instellen van de pH op een waarde van 8,0 onder toepassing van een 50% NaOH-oplossing en werd verwarmd tot 152°C onder toepassing van een spuit-kookinstallatie. De duur van het verwarmen was 9 seconden. Na de warmtebehandeling werd het stremsel afgekoeld tot 40°C. Het afgekoelde stremsel werd ingesteld op een pH-waarde van 10 door toevoeging van 50% NaOH-oplossing onder snel roeren. Hieraan werd 1,5% papaïne, (Amano), gebaseerd op het droge gewicht van het eiwit, toegevoegd in de vorm van een 10%-waterige suspensie en gemengd onder snel roeren. Het mengsel werd gedurende 60 minuten in reactie gebracht, terwijl de pH-waarde werd gehandhaafd op 10 met een 50% NaOH-oplossing. Het gereageerde mengsel werd ingesteld op een pH-waarde van 7,5–7,9 met geconcentreerd HCl en verwarmd om het enzym te activeren. Het inactiveren werd uitgevoerd door het mengsel te verwarmen tot 152°C. De duur van het verwarmen was ongeveer 9 seconden en de totale tijd voor het inactiveren van het reactiemengsel bedroeg ongeveer 43 minuten. Het geïnactiveerde mengsel werd daarna gesproeidroogd. De eigenschappen van het gesproeidroogde materiaal zijn vermeld in tabel A.

15

Voorbeeld II

- Het onder spuiten gekookte stremsel van voorbeeld I werd afgekoeld tot 46°C, waarvan de pH werd ingesteld op 10 en werd behandeld met 2,0% pancreatine (Rohm COROLASE (merk)), op basis van het droge gewicht van het stremsel, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH-waarde werd gedurende 37 minuten reactietijd gehandhaafd op een waarde van 10. De pH-waarde van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd geïnactiveerd door verwarmen en gesproeidroogd zoals aangegeven in voorbeeld I. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

20

Voorbeeld III

- Het onder spuiten gekookte stremsel van voorbeeld I werd afgekoeld tot 46°C, de pH-waarde werd ingesteld op 10 en het werd behandeld met het 5% alcalase 2,4 L (Novo Laboratories), op basis van het droge gewicht van het stremsel. Het mengsel werd in reactie gebracht zoals aangegeven in voorbeeld I. De pH-waarde werd gehouden op 10 tijdens de 82 minuten durende reactie voor het mengsel. De pH-waarde van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gesproeidroogd zoals beschreven in voorbeeld I. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

30

Voorbeeld IV

- Van het stremsel beschreven in voorbeeld I werd bij kamertemperatuur de pH-waarde ingesteld op 10 en het werd behandeld met 1,5% papaïne (Amano), berekend op het droge gewicht van het stremsel, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH werd gehandhaafd op 10 gedurende een 52 minuten durende reactie voor het mengsel. De pH-waarde van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gesproeidroogd zoals beschreven in voorbeeld I. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

35

Voorbeeld V

- Het stremsel van voorbeeld I werd afgekoeld tot 10°C, de pH werd ingesteld op 10 en het werd behandeld met 1,5% pancreatine (Rohm COROLASE (merk)), berekend op droog gewicht, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH werd gedurende de 60 minuten durende reactie voor het mengsel gehandhaafd op 10. De pH-waarde van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd geïnactiveerd door verwarmen en gevriesdroogd. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

45

Voorbeeld VI

- Van het stremsel van voorbeeld I werd bij kamertemperatuur de pH ingesteld op 10 en behandeld met 0,6% alcalase 2,4 L (Novo Laboratories), op basis van het droge gewicht zoals beschreven in voorbeeld I. De pH werd gehouden op 10 gedurende een reactietijd van 20 minuten. De pH van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gevriesdroogd. De eigenschappen van het product zijn samengevat in tabel A.

50

Voorbeeld VII

- Van het stremsel uit voorbeeld I werd bij kamertemperatuur de pH ingesteld op 10 en behandeld met 0,25% papaïne, berekend op het droge gewicht, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH werd gehouden op 10 tijdens de 90 minuten durende reactie voor het mengsel. De pH-waarde van het reactiemengsel werd

55

daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gevriesdroogd. De product-eigenschappen zijn vermeld in tabel A.

Voorbeeld VIII

- 5 Van het stremsel uit voorbeeld I werd bij kamertemperatuur de pH ingesteld op 9 en het werd behandeld met 1,0% papaïne, berekend op het droge gewicht, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH-waarde werd gehandhaafd op 9 gedurende de reactietijd van 90 minuten. De pH van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gevriesdroogd. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

10

Voorbeeld IX

Van het stremsel uit voorbeeld I werd bij kamertemperatuur de pH-waarde ingesteld op 11 en behandeld met 1,0% papaïne, berekend op het droge gewicht, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH werd gehandhaafd op 11 tijdens de 90 minuten gedurende reactie voor het mengsel. De pH-waarde van het reactie-

- 15 mengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd geïnactiveerd door verwarmen en gevriesdroogd. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

Voorbeeld X

Het stremsel uit voorbeeld I werd bij kamertemperatuur verwarmd tot 65°C, de pH werd ingesteld op 10 en
20 het werd behandeld met 1,0% papaïne, berekend op het droge gewicht van het stremsel, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH-waarde werd gehandhaafd op 10 tijdens de 45 minuten durende reactietijd voor het mengsel. De pH van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gevriesdroogd. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

25 Voorbeeld XI

Het stremsel van voorbeeld I werd verwarmd van kamertemperatuur tot 90°C gedurende 5 minuten, afgekoeld tot kamertemperatuur, de pH-waarde werd ingesteld op 10 en het werd behandeld met 0,45% trypsine (Sigma T8253), berekend op basis van het droge gewicht van het stremsel, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH werd gehouden op 10 tijdens de 30 minuten durende reactie van het mengsel. De
30 pH-waarde van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gevriesdroogd. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

Voorbeeld XII

Het onder spuiten gekookte stremsel van voorbeeld I werd afgekoeld tot kamertemperatuur, verdund van
35 10% vaste stof met een buffer met een pH van 10 en behandeld met 1,0% chymotrypsine (Sigma C4129), op basis van het droge gewicht van het stremsel, zoals beschreven in voorbeeld I. De pH-waarde werd gehouden op 10 tijdens de reactietijd van 120 minuten voor het stremsel. De pH-waarde van het reactiemengsel werd daarna ingesteld op 7,5. Het product werd door verwarmen geïnactiveerd en gevriesdroogd. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

40

Voorbeeld XIII

Van het onder spuiten gekookte stremsel van voorbeeld I werd de pH-waarde ingesteld op 10 en het werd behandeld met 1,5% papaïne, op basis van het droge gewicht, zoals beschreven in voorbeeld I. De
pH-waarde werd gehouden op 10 tijdens de 30 minuten durende reactie. Het product werd door verwarmen
45 geïnactiveerd bij pH is 10 en gesproeidroogd zoals beschreven in voorbeeld I. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

Voorbeeld XIV

Van het stremsel van voorbeeld I werd bij kamertemperatuur de pH-waarde ingesteld op 10 en het werd
50 behandeld met 0,75% papaïne, berekend op het droge gewicht van het stremsel. Het enzym en NaOH werden in een continu werkend systeem toegevoegd. De pH-waarde werd gehandhaafd op 10 door toevoeging tijdens het stromen van het mengsel. De reactie had plaats in twee vaten met een verblijftijd van 15 minuten in het eerste vat en een reactietijd van 45 minuten in het tweede vat. De pH-waarde van het reactiemengsel werd daarna ingesteld onder stromen, op 7,5. Het product werd geïnactiveerd door
55 verwarmen en gesproeidroogd zoals beschreven in voorbeeld I. De eigenschappen van het product zijn vermeld in tabel A.

Vergelijkend voorbeeld 1

Ter vergelijking werd het stremsel gekookt onder spuiten van voorbeeld I ingesteld op een pH-waarde van 7 en behandeld met 1,0% bromeline. De pH daalde tijdens de hydrolyse. Na 30 minuten reactie werd het enzym door verwarmen geïnactiveerd en gesproeidroogd zoals beschreven in voorbeeld I. De eigenschappen van het verkregen product zijn vermeld in tabel A.

Vergelijkend voorbeeld 2

Het stremsel van voorbeeld I werd bij kamertemperatuur behandeld volgens een opzicht bekende werkwijze zoals beschreven in het Amerikaanse octrooischrift 3.694.221. Het stremsel met een vaste stofgehalte van 12% werd ingesteld op een pH van 7,0 en gekookt onder spuiten tot 152°C gedurende 9 seconden en afgekoeld tot 49°C. De pH-waarde van het stremsel werd daarna verhoogd tot 8,5 en het stremsel werd behandeld met 1,0% alcalase, berekend op het droge gewicht. Het mengsel werd gedurende 120 minuten in reactie gebracht en daarna onder spuiten gekookt tot 152°C gedurende 9 seconden om het enzym te inactiveren.

TABEL A
Samenvatting van de eigenschappen

voor- beeld	enzym	deami- deren (%) *1	TNBS *2	bitter- heid *3	oplosbaarheid (%) *4		MWD *5	
					pH=7,0	pH=5,5	Mn	Mw
I	papaïne	26	57	1,3	74	42	2615	16052
II	pancreatine	25	114	1,1	79	57	1204	8000
III	alcalase	28	182	5,3	88	88	1069	6727
IV	papaïne	16	45	1,3	61	22	3349	22650
V	pancreatine	20	33					
VI	alcalase	28	164		82	74	1909	10333
VII	papaïne	9	42					
VIII	papaïne	14						
IX	papaïne	16						
X	papaïne	18	73				2274	11573
XI	trypsine	14	29		62	10		
XII	chymotrypsine	29						
XIII	papaïne	26	54		41			
XIV	papaïne	11	45		68	24		
1	bromelaïne		60	7,1	37	28	2599	15585
2	alcalase		196		62	57		

opmerking:

*1 De diffusiemethode van Conway en O'Malley (J. Biochem, 36:655, 1942) wordt gebruikt om de hoeveelheid NH_3 te meten die vrijkomt nadat een 1,25% suspensie van het product in 3 N HCl was verwarmd in een afgesloten houder, gedurende 3 uren bij 110°C. Als referentie voor 0% deamidieren geldt 18,3 mg NH_3 per g niet gedeamideerd eiwit.

*2 Aantal mol eindgroepen per 10^5 g eiwit, gemeten volgens een methode van R. Fields (Biochem, J., 124, 581, 1971). Niet-gehydrolyseerde soja-eiwitten hebben een gemiddelde TNBS-waarde van 30.

*3 Methode volgens J.L. Shen, Cereal Chem. 53:902 (1976).

*4 De verdeling van het molecuulgewicht zoals bepaald door HPLC in 6M GuHCl en dithiothreitol onder toepassing van TSK 2000 grootte uitsluitingskolom (Pharmacia, Pleasant Hill, CA). Mn = het getal gemiddeld molecuulgewicht uitgedrukt in Daltons. Mw = gewichtsgemiddeld molecuulgewicht uitgedrukt in Daltons.

*5 De beoordeling van de bitterheid door een ervaren smaakpanel van 3% suspensies in water bij pH is 7,0 en 50°C. 0 = het minst bitter, 10 = het meest bitter.

Zoals weergegeven in tabel A is het volgens de onderhavige werkwijze mogelijk de gewenste combinatie en

karacteristieken te kiezen voor het te verkrijgen product. Men kan bijvoorbeeld binnen bepaalde grenzen de mate van oplosbaarheid kiezen en de gewenste deamideringsgraad voor een bepaald eindproduct, afhankelijk van het later gebruik van het product.

De functionele eigenschappen van de verschillende producten, bereid volgens de werkwijze volgens de uitvinding zijn samengevat in de tabellen B-E.

TABEL B
pH-oplosbaarheidsprofiel (% oplosbaar eiwit *6)

10 pH	voorbeeld IV	voorbeeld II	voorbeeld III	vergelijkend voorbeeld 1
2,0	63%	83%	84%	19%
4,0	22%	55%	80%	18%
15 4,5	19%	55%	73%	21%
5,0	22%	58%	82%	23%
6,0	35%	64%	86%	30%
7,0	61%	79%	88%	37%
9,0	68%	87%	88%	38%

*6 Oplosbaarheidsmethode volgens J.L. Shen, Cereal Chem. 53:902 (1976).

TABEL C
dichtheid van het schuim *7)

	pH = 7,0	pH = 5,2
voorbeeld IV	0,092 g/cc	0,099 g/cc
30 voorbeeld II	0,061 g/cc	0,074 g/cc
voorbeeld III	0,065 g/cc	0,060 g/cc
vergelijkend voorbeeld 1	0,084 g/cc	0,085 g/cc

*7) De werkwijze voor de bereiding van het schuim is als volgt. Men bracht 15 g van het product tot suspensie in 135 g water en dit mengsel werd opgeklopt met een draadvormige klopper gedurende 6 minuten met een hoge snelheid (10) onder toepassing van een "Kitchen Aid" model K5A-menger. Na opkloppen werd de dichtheid gemeten met een "5 oz. Solo cup."

TABEL D
capaciteit van de emulsie bij pH = 7 *8)

product	capaciteit van de emulsie (ml olie/g product)
45 voorbeeld IV	131
voorbeeld II	98
voorbeeld III	52
vergelijkend voorbeeld 1	113

*8) De werkwijze is als volgt: een suspensie van 100 ml van een 0,5% product in water wordt overgebracht naar een mengvat van 1 l. Sojabonolie wordt met een constante stroomsnelheid van 49 ml/min onder mengen toegevoegd aan de suspensie onder toepassing van een "Waring Blender" (model 70129) bij een rotatie van 15300 omwentelingen per minuut tot een fase-inversie optreedt van olie-in-water-emulsie tot water-in-olie-emulsie. Het eindpunt wordt bepaald door daling van de geleiding. De capaciteit van de emulsie wordt berekend nadat rekening is gehouden met de blanco-waarde voor water.

- De onderhavige uitvinding heeft zodoende betrekking op een werkwijze voor de bereiding van een plantaardig eiwitproduct met een voortreffelijke oplosbaarheid in waterige oplossingen. Het product vertoont een sterk verbeterde oplosbaarheid en andere functionele eigenschappen ten opzichte van de bekende materialen, en kan in een ruim aantal voedingsmiddelen worden verwerkt ter vorming van met eiwit
- 5 versterkte voedingsmiddelen. De werkwijze omvat het onderwerpen van een waterig eiwithoudend materiaal aan een gecontroleerde deamidering door een proteolytisch enzym, onder toepassing van zorgvuldig geregelde pH-omstandigheden om het eiwit te hydrolyseren en te modificeren, en het verwarmen van het eiwit om het enzym te inactiveren en de reactie te stoppen. Het waterige eiwit kan worden gedroogd en een gedroogd, poedervormig eiwitproduct wordt gewonnen dat sterk oplosbaar is in water, tot een zodanige
- 10 mate dat nagenoeg al het gemodificeerde eiwit desgewenst oplosbaar kan worden gemaakt in een waterig systeem. Deze verhoging van de oplosbaarheid wordt verkregen zonder overmatige hydrolyse van het eiwit.
- De uitvinding heeft tevens betrekking op voedingsproducten, waarin het eiwitmateriaal, verkregen volgens de uitvinding, is verwerkt.

15

Conclusies

1. Werkwijze voor het behandelen van een eiwitmateriaal door een waterige suspensie van het eiwitmateriaal bij een pH-waarde van meer dan 7 te onderwerpen aan de werking van een proteolytisch enzym,
- 20 zonder in het behandelende eiwit een bittere smaak teweeg te brengen, met het kenmerk, dat een eiwitmateriaal dat een onoplosbare fractie bevat, wordt behandeld door de pH-waarde op 9 of hoger te brengen, het proteolytische enzym toe te voegen, en de suspensie vervolgens te doen reageren gedurende een tijd en bij een temperatuur die in combinatie met de pH-waarde en het enzym zodanig zijn dat het eiwit gedeeltelijk wordt gehydrolyseerd en gedeeltelijk wordt gedeamideerd, welke behandeling effectief is om in
- 25 hoofdzakelijk gelijkmatig over nagenoeg het gehele eiwitsubstraat, met inbegrip van de onoplosbare fractie van het eiwitsubstraat, te hydrolyseren en te deamideren, welke gecontroleerde hydrolyse en deamidering effectief zijn om de oplosbaarheid van het eiwit aanzienlijk te verhogen en de functionele eigenschappen van het eiwit te verhogen.
2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de pH-waarde van de suspensie wordt ingesteld
- 30 tussen 9 en 11.
3. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de behandelde suspensie in reactie wordt gebracht bij een temperatuur tussen 10°C en 75°C.
4. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het enzym wordt toegevoegd op een niveau van 0,01 gew.% tot 5 gew.%, gebaseerd op het droge gewicht van het eiwit in de suspensie.
- 35 5. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het eiwit wordt gedeamideerd tot tussen 5% en 48%.
6. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het eiwitmateriaal een afgescheiden soja-eiwit is.
7. Voedingsproducten waarin het eiwitmateriaal is verwerkt, met het kenmerk, dat het eiwitmateriaal is verkregen volgens een werkwijze beschreven in conclusies 1-6.