



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101784199 A

(43) 申请公布日 2010.07.21

(21) 申请号 200880103597.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.08.12

A23L 1/015 (2006.01)

(30) 优先权数据

C02F 1/42 (2006.01)

11/838, 153 2007.08.13 US

C02F 1/44 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

C02F 1/58 (2006.01)

2010.02.20

C02F 1/74 (2006.01)

C12N 9/82 (2006.01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/072921 2008.08.12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/023674 EN 2009.02.19

(71) 申请人 福瑞托-雷北美有限公司

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 文森特·艾伦·艾尔德

克里斯托弗·詹姆斯·科赫

詹姆斯·基思·亨森

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 郑小粤

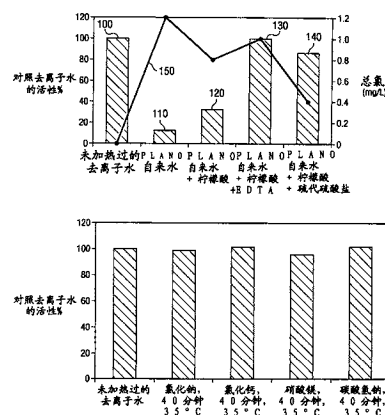
权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

在溶液中增加天冬酰胺酶活性的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种稳定的天冬酰胺酶溶液。一方面,处理饮用水以减少氯含量,从而提高剩余的天冬酰胺酶的酶活性。所述处理可以通过去除氯元素或通过提供减少氯含量的添加剂进行。添加剂可以包括还原剂和氯清除剂。去除技术可以包括活性炭、离子交换和吹脱法的使用。



1. 一种在溶液中增加天冬酰胺酶活性的方法,所述方法包括以下步骤:
 - a) 处理饮用水以制备处理过的水,其中所述处理过的水具有低于 0.5ppm 的氯浓度;和
 - b) 将天冬酰胺酶与所述处理过的水混合以制备天冬酰胺酶溶液。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,还包括用酸处理所述饮用水。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,还包括用活性碳处理所述饮用水。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,对步骤 a) 中的所述处理过的水使用离子交换树脂进行处理。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,对步骤 a) 中的所述处理过的水使用反向渗透进行处理。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,对所述处理过的水通过吹脱法进行处理。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述天冬酰胺酶溶液具有至少 80% 的剩余的活性。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,对所述处理过的水用还原剂进行处理。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述还原剂包括选自氯化亚锡二水合物、亚硫酸钠、焦亚硫酸钠、抗坏血酸、抗坏血酸衍生物、异抗坏血酸、抗坏血酸衍生物的盐、铁、锌、亚铁离子和其混合物中的一种或多种试剂。
10. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述处理过的水具有低于 8.0 的 pH 值。
11. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,对所述饮用水用足量的添加剂进行处理以将氯的最终含量减少至低于如果没有添加所述添加剂的氯的含量。
12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,对所述处理过的水用氯清除剂进行处理。
13. 根据权利要求 11 所述的方法,其中,所述添加剂包括硫代硫酸盐。
14. 一种由饮用水制备稳定的酶溶液的方法,所述方法通过使足量的来自所述饮用水的一种或多种减少活性的成分失活,从而在酶已经被添加至所述饮用水之后的至少 30 分钟内提供剩余的酶活性。
15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,所述减少活性的成分包括氯。
16. 根据权利要求 15 所述的方法,其中,所述氯通过将所述饮用水传送通过活性碳而被去除。
17. 根据权利要求 14 所述的方法,其中,将 EDTA 添加至所述饮用水。
18. 一种系统,所述系统
饮用水源;
天冬酰胺酶源;
在所述饮用水与所述天冬酰胺酶混合之前可以处理所述饮用水的处理系统;和可以将处理过的饮用水与天冬酰胺酶混合的传送系统。
19. 根据权利要求 18 所述的系统,其中,所述处理系统将氯去除。
20. 根据权利要求 18 所述的系统,其中,所述处理系统使氯失活。

在溶液中增加天冬酰胺酶活性的方法

[0001] 发明背景

技术领域

[0002] 本发明涉及一种在食品产品中减少天冬酰胺酸（丙烯酰胺的前体）的数量的方法。更具体地，本发明涉及在溶液中增加天冬酰胺酶的酶稳定性。

[0003] 相关技术的说明

[0004] 如 U. S. 第 7, 037, 540 号专利中讨论的，丙烯酰胺已经在含有天冬酰胺酸的热加工食品中被发现。在一些食品产品中生成的丙烯酰胺的含量可以通过在烹制食品产品之前将天冬酰胺酶添加至食品产品被减少。

[0005] 与分批规模相对，商业规模的将例如天冬酰胺酶的丙烯酰胺还原酶添加至食品产品存在许多挑战。例如，天冬酰胺酶必须与游离天冬酰胺酸接触以促进天冬酰胺酸的水解。由于酶通常以相对浓缩的形式提供，理想地，在食品产品与酶溶液接触之前，酶在水溶液中被混合并被稀释。例如，食品产品与酶溶液的接触可以包括形成面团并且将酶溶液与所述面团混合。

[0006] 定量酶活性的已知方法是根据单位表示酶。酶活性的一个单位被定义为一分钟内催化剂转化一微摩尔底物所需要的酶数量。从而，已知底物或化合物，例如食品产品中天冬酰胺酸的相对浓度，和食品产品的数量，任何人可以计算出将所需要的化合物（在这种情况下是天冬酰胺酸）转化至不同化合物所需要的酶（例如天冬酰胺酶）的单位。

[0007] 对于前面未知的原因，甚至当过量（意味着转化食品产品中的全部天冬酰胺酸需要多于计算出的预期数量）的天冬酰胺酶用于食品产品（例如马铃薯泥或玉米湿润粉糊）时，在面团中仍时常有可测量的天冬酰胺酸的含量。由于当某一食品被热加工时，需要减少生成的丙烯酰胺的含量，需要有一种系统和方法让所使用的酶的效力最大化以减少商业规模制作的食品产品中的丙烯酰胺前体。

发明内容

[0008] 一方面，本发明涉及由从饮用水中去除氯的所述水制备稳定的天冬酰胺酶溶液的方法。一方面，氯通过离子交换、反向渗透、活性碳和 / 或吹脱法 (air stripping) 去除。一方面，使用例如还原剂和氯清除剂的添加剂处理饮用水。一方面，随后，处理过的水与天冬酰胺酶混合以制备天冬酰胺酶溶液。本发明上述和其它的特点和优点将会下面的文字描述中变得很明显。

附图说明

[0009] 被认为是本发明特点的新颖性特点在所附的权利要求中列出。不过，通过参考以下对说明性的实施例的详细描述并结合附图阅读时，本发明本身及其优选使用方式，进一步的目的及其优点就能被最好地理解，其中：

[0010] 图 1a 是在饮用水的各种处理之后剩余的酶活性的图表；和

[0011] 图 1b 是各种盐水混合物的剩余的酶活性的图表。

[0012] 发明详述

[0013] 在一个实施例中,本发明涉及提供提高天冬酰胺酶的稳定性和保持天冬酰胺酶的活性的水溶液。由于天冬酰胺酸是丙烯酰胺的前体,提高的天冬酰胺酶的活性可以转化为食品产品中的更加有效的丙烯酰胺的减少。在此使用的术语“酶活性”以单位表达。每个单位的天冬酰胺酶可以在一分钟内水解一微摩尔的天冬酰胺酸。

[0014] 在一个实施例中,由热加工形成的需要减少丙烯酰胺含量的食品产品由面团形成。术语“加工零食”意思是使用除了一些最初的、未改性的淀粉原料之外的原料的零食食品。例如,加工零食包括使用脱水马铃薯产品作为原料的加工马铃薯片和使用湿润粉糊面粉作为原料的加工玉米片。在此需要注意的是,脱水马铃薯产品可以是马铃薯面粉、马铃薯薄片、马铃薯颗粒或以脱水马铃薯存在的其它形式。当任何这些术语用于本申请中时,应该理解的是包括全部这些变化。仅仅通过举例的方式而不是为了限制,可以添加天冬酰胺酶溶液的“加工食品”的例子包括玉米粉圆饼片、玉米片、由马铃薯薄片和 / 或新鲜的马铃薯泥制作的马铃薯片、多种谷物片、玉米泡芙、小麦泡芙、大米泡芙、饼干、面包 (例如黑麦、小麦、燕麦、马铃薯、白色的全粒谷物和混合面粉)、柔软且脆的脆饼干、面粉糕饼、曲奇、吐司面包、玉米粉圆饼、面粉圆饼、皮塔面包、新月形面包、派皮、松饼、布朗尼、蛋糕、百吉饼、油炸圈饼、谷类食品、挤出零食、格兰诺拉麦片产品、面粉、玉米粗粉、湿润粉糊、马铃薯薄片、以玉米或大麦或栗粉等煮的粥、(滚在鱼肉上的) 搅匀的蛋白和面粉的混合物和面团产品、冷冻和冻结的面团、再造食品、加工和冻结的食品、滚在肉和蔬菜上的面包、马铃薯煎饼、马铃薯泥、可丽饼、薄烤饼、华夫饼干、比萨饼皮粉、花生酱、含有剁碎加工的坚果、凝胶剂、填充剂、水果泥、蔬菜泥的食品、例如啤酒和淡色啤酒的酒精饮料、可可豆、可可豆粉末、巧克力、热巧克力、干酪、例如狗和猫的咬胶的动物食品和由面团或各种成分的混合物制作的易于压片或挤出的任何其它的人或动物食品产品。

[0015] 在此使用的术语“加工食品”包括前面定义的加工零食。在此使用的术语“食品产品”包括前面定义的全部加工零食和加工食品。

[0016] 在此使用的热加工食品包括可以用天冬酰胺酶溶液处理的食物,通过举例而不是限制的目的,前面列举的全部食品作为加工零食和加工食品的例子,还包括炸薯条、切片马铃薯、炸山药条、炸其它块茎或根茎原料的条、包括烹制的芦笋、洋葱和西红柿的烹制蔬菜、咖啡豆、可可豆、烹制的肉、脱水水果和蔬菜、热加工的动物饲料、烟草、茶、烘烤过的或烹制过的坚果、大豆、糖蜜、例如烤肉酱的沙司、香蕉片、苹果片、油炸香蕉和其它的烹制水果。

[0017] 根据一些这样的实施例,制备面团所需要的成分与水混合在一起,并且所需要的天冬酰胺酶的数量也与处理过的水混合以制备天冬酰胺酶溶液。随后,天冬酰胺酶溶液可以被添加至面团。在一个实施例中,天冬酰胺酶溶液直接与所需要的成分混合以制备面团。随后,面团被制成热加工食品产品。

[0018] 在商业设备中,形成面团和天冬酰胺酶溶液所使用的水是容易进入设备的水,其通常是从当地市政供水被供应至最终使用者的饮用水。在此使用的“饮用水”意思是从适于饮用的供水供应的水,并包括但不限于来自市政供水的水。几乎全部的美国市政供水在饮用水中添加了足够的氯,所以饮用水在客户的水龙头处具有剩余的氯。由于氯胺比氯更加稳定,许多市政水区域在饮用水中添加了氯胺。在此使用的氯被定义为氯的氧化形式,包

括但不限于氯胺和次氯酸盐。同样地,例如盐酸(HCl)和氯化钠(NaCl)提供的氯离子的非氧化形式被排除在所述定义之外。

[0019] 本发明人已经发现例如存在氯的饮用水的一些特点将天冬酰胺酶的活性减少至其在食品生产的商业装置中不能起作用的点。在此使用的“剩余的酶活性”(被表示为“%”)指对照组的酶活性除以样品的酶活性,并且提供了在各种试验条件下的酶活性的相对测量。本发明还已经确定了减少饮用水对酶活性的影响并保持天冬酰胺酶的剩余的酶活性,使得其在商业装置中起作用的方法和系统。下面的例子是前述的说明。

[0020] 例 1

[0021] 四种溶液由几份溶液(aliquot)形成,每份溶液具有添加的最初相等的天冬酰胺酶(Novozymes A/S)活性,并且每份溶液用蒸馏水或饮用水稀释,使得每份溶液具有 50mL 的总体积。3 号和 4 号溶液的饮用水是来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域供应的饮用水。每种溶液中使用的水的类型在下面的表 1a 中被描述。

[0022] 表 1a. 制备天冬酰胺酶溶液使用的水的类型

[0023]

溶液号	水的类型
1	蒸馏水
2	蒸馏水
3	来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水
4	与添加的 0.1N 的盐酸混合以获得 pH 值 6 的来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水

[0024] 2 号至 4 号溶液中的每一种在被测量酶活性和 pH 值之前,在 35℃被加热 40 分钟,使用 1 号溶液的 pH 值作为剩余的酶活性对照的对照组。1 号溶液在 10℃被冷冻 40 分钟。

[0025] 测量值在下面的表 1b 中被显示:

[0026] 表 1b. 蒸馏水和饮用水的剩余的酶活性

[0027]

溶液号	溶液的 pH 值	相对活性
1	6.93	100%
2	7.00	103%
3	8.22	38%
4	7.55	48%

[0028] 应该注意地是,使用本公开最后描述的试验方法进行酶活性和剩余的酶活性的试验结果的测量。对照 1 号溶液(对照组)、2 号溶液没有失去酶活性。3 号溶液是具有 pH 值

8.22 的弱碱性,并且天冬酰胺酶在 35℃加热 40 分钟之后失去了 62%的活性。添加了稀释的盐酸的饮用水(4 号溶液)将 pH 值减少至 7.55,并且天冬酰胺酶在 35℃加热 40 分钟之后失去了 48%的活性。因此显示 3 号溶液的碱度对失去一些酶活性有责任。通常公认的是,pH 值对天冬酰胺酶活性有影响并且当 pH 值在 4 至 7 之间时天冬酰胺酶的活性较高。

[0029] 例 2

[0030] 四种溶液由几份溶液形成,每份溶液具有最初相等的天冬酰胺酶(Novozymes A/S)活性,并且每份溶液用去离子水或饮用水稀释,使得每种溶液具有 50mL 的总体积。每种溶液中使用的水的类型在下面的表 3 中被描述:

[0031] 表 2a. 由不同水供给制备的天冬酰胺酶溶液

[0032]

溶液号	水的类型
1	去离子水(对照组)
2	来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水
3	来自被供应至美国, TX 的 Duncanville 的居民的饮用水
4	在 Mexico, Mexicali 用于食品生产加工中使用的水

[0033] 2 号至 4 号溶液中的每一种在被测量氯含量、水硬度、pH 值和酶活性之前,在 35℃被加热 40 分钟。对照组未被加热。测量值在下面的表 2b 中被显示。

[0034] 表 2b. 三种不同的饮用水溶液的剩余的酶活性和水化学

[0035]

溶液号	游离氯 (mg/L)	总氯 (mg/L)	总硬度 (mg/L)	pH 值	活性
1	0	0	0	6.89	100%
2	1.0	1.0	232	7.47	9%
3	0.02	0.02	90	7.87	85%
4	0.02	0.06	28	8.00	89%

[0036] 这一数据清楚地证明了氯对剩余的酶活性的消极影响。例如,1 号溶液(对照组)没有氯并具有最高的剩余的酶活性。2 号溶液具有最低含量的剩余的酶活性,和最高含量的游离氯和总硬度。

[0037] 3 号溶液具有相对低浓度的游离氯和中等硬度水平,以及高于 80%的剩余的酶活性。4 号溶液具有类似于 3 号溶液的游离氯的浓度和较低的硬度水平,具有稍微高些的剩余的酶活性。表 2b 证明了天冬酰胺酶的剩余的酶活性与氯含量成反比例。

[0038] 例 3

[0039] 四种溶液由几份溶液形成,每种溶液具有最初相等的天冬酰胺酶 (Novozymes A/S) 活性,并且每份溶液用去离子水或饮用水稀释,使得每种溶液具有 50mL 的总体积。每种样品中使用的水的类型在下面的表 3a 中被描述。

[0040] 表 3a. 制备天冬酰胺酶溶液中使用的加氯的水的类型

[0041]

溶液号	水的类型
1	去离子水 (对照组)
2	去离子水 + 足量的次氯酸盐以产生 12ppm 的氯
3	来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水
4	通过 BRITA 过滤器过滤三次的来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水

[0042] 2 号至 4 号溶液中的每一个在被测量游离氯、总硬度、pH 值和酶活性之前,在 35°C 被加热 40 分钟。

[0043] 测量值在下面的表 3b 中被显示:

[0044] 表 3b. 具有各种氯含量的溶液的剩余的酶活性

[0045]

溶液号	游离氯 (mg/L)	总硬度 (mg/L)	pH 值	活性
1	0	—	4.81	100%
2	未测量	—	5.87	4%
3	未测量	228	7.10	21%
4	0	20	4.99	102%

[0046] 如上面的表 3b 显示的,如 2 号溶液显示的添加氯的去离子水或如 3 号溶液显示的存在氯的饮用水明显地减少了天冬酰胺酶的剩余的活性。此外,去除或没有氯的如 1 号溶液中的去离子水中的剩余的酶活性的含量和 4 号溶液中的 BRITA 过滤过的水中的剩余的酶活性证明了清楚显示的较高的酶活性。由于氯以次氯酸钠的形式被添加至溶液,2 号溶液的氯含量未被测量。同样,由于存在饮用水,3 号溶液中的相对氯含量对于模拟饮用水标准是已知的。

[0047] 例 4

[0048] 这一试验的目的是分析氯对酶活性的影响,这通过将饮用水中发现的氯的数量添加至没有氯的去离子水中以确定氯对天冬酰胺酶活性的影响。

[0049] 四种溶液由几份溶液形成,每份溶液具有最初相等的天冬酰胺酶 (Novozymes A/S) 活性,并且每份溶液用去离子水或饮用水稀释,使得每种溶液具有 50mL 的总体积。每种

样品中使用的水的类型在下面的表 4a 中被描述。

[0050] 表 4a. 制备天冬酰胺酶溶液所使用的加氯的水的类型

[0051]

溶液号	水的类型
1 (对照组)	去离子水
2	具有足量的次氯酸钠的酸化去离子水, 产生具有 1.2ppm 的氯的水, 并且足量的次氯酸产生酸性 pH 值
3	具有足量的次氯酸钠的酸化去离子水产生具有 0.2ppm 的氯的水, 并且足量的次氯酸产生酸性 pH 值
4	来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水

[0052] 2 号至 4 号溶液中的每一种在被测量氯、pH 值和剩余的酶活性之前, 在 35°C 被加热 40 分钟。1 号溶液未被加热。测量值在下面的表 4b 中被显示:

[0053] 表 4b. 具有不同含量的氯的溶液的剩余的酶活性

[0054]

溶液	游离氯 (mg/L)	总氯 (mg/L)	pH 值	活性
1	—	—	4.85	100
2	1.2	1.2	4.69	3
3	0.1	0.2	4.62	108
4	0.8	1.1	6.84	14

[0055] 上面的表 4b 中的数据证明当单独将氯添加至水中时, 剩余的天冬酰胺酶活性明显地减少。然而, 在相对的低含量, 氯对剩余的酶活性有较小的影响。

[0056] 例 5

[0057] 制备五种溶液以确定饮用水的变化对剩余的天冬酰胺酶活性的潜在影响。每种溶液由几份溶液形成, 每份溶液具有最初相等的天冬酰胺酶 (Novozymes A/S) 活性, 并且每份溶液用去离子水或饮用水稀释, 使得每种溶液具有 50mL 的总体积。添加柠檬酸以制备微酸性溶液。每种溶液中使用的水的类型在下面的表 5a 中被描述:

[0058] 表 5a. 饮用水的变化

[0059]

溶液号	水的类型
1	去离子水

溶液号	水的类型
2	来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水
3	用足量的柠檬酸酸化的来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水以具有 100ppm 的柠檬酸
4	用足量的柠檬酸酸化的来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水以具有 100ppm 的柠檬酸和 950ppm 的 EDTA
5	用足量的柠檬酸和足量的硫代硫酸盐酸化的来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水以具有 100ppm 的柠檬酸和 10ppm 的硫代硫酸钠

[0060] 2 号至 5 号溶液中的每一种在被测量游离氯、总氯、pH 值和剩余的酶活性之前, 在 35℃ 被加热 40 分钟。1 号溶液未被加热。测量值在下面的表 5b 中被显示:

[0061] 表 5b. 各种处理过的饮用水溶液的剩余的酶活性

[0062]

溶液	游离氯 (ppm)	总氯 (ppm)	pH 值	剩余的酶活性
1	0	0	—	100%
2	0.2	1.2	7.53	12%
3	0.4	0.8	5.81	32%
4	1.0	1.0	6.45	100%
5	0.1	0.4	5.65	86%

[0063] 图 1a 是在饮用水的各种处理之后剩余的酶活性的图表。酶活性通过条以条形图表示, 并且总氯浓度通过线 (150) 表示。如数据证明的, 硫代硫酸盐 (以大于饮用水中氯浓度的 5 倍水平添加) 减少了氯浓度并将酶活性增加至 86% (140)。具有 1.2ppm 总氯的饮用水仅仅具有相对低的 12% (110) 的剩余的活性。柠檬酸减少了饮用水中的氯含量且将酶活性增加至 32% (120)。

[0064] 具有 EDTA 的饮用水中的酶活性 (130) 等于去离子水 (100) 中的酶活性, 但是 EDTA 仅仅稍微减少总氯。不受理论的限制, 申请人据信 EDTA 既可以覆盖在酶上从而保护酶不受氯影响, 也可以认为 EDTA 可以阻碍氯的影响。例如, 当试验时氯仍然出现, 但是 EDTA 和氯之间的可逆反应可以避免氯的氧化或者避免氯与天冬酰胺酶反应。从而, EDTA 看起来使氯失活。因此, 在一个实施例, 可以添加抑制使天冬酰胺酶的活性减少的氯的添加剂和 / 或使氯失活的添加剂。

[0065] 例 6

[0066] 制备五种溶液以确定通常在饮用水中发现的硬水成分的潜在影响。每种溶液由几份溶液形成,每份溶液具有最初相等的天冬酰胺酶 (Novozymes A/S) 活性,并且每份溶液用去离子水或饮用水稀释,使得每种溶液具有 50mL 的总体积。每种添加盐的盐溶液实现 5mM(5 毫摩尔) 的盐浓度,这大约是来自 TX, Plano 的饮用水中发现的碳酸钙浓度的两倍。例如,参考上面的表 3b,3 号溶液 (Plano 饮用水) 的总硬度是 228mg/L,这相当于 2.28mM。每种溶液中使用的各种类型的盐在下面的表 6a 中描述:

[0067] 表 6a. 添加至去离子水中的盐

[0068]

溶液号	水的类型
1	去离子水
2	去离子水 + 氯化钠
3	去离子水 + 氯化钙
4	去离子水 + 硝酸镁
5	去离子水 + 碳酸氢钠

[0069] 2 号至 5 号溶液中的每一种在被测量剩余的酶活性之前,在 35℃ 被加热 40 分钟。测量值在下面的表 6b 中被显示:

[0070] 表 6b. 各种盐水混合物的剩余的酶活性

[0071]

溶液	活性
1	100%
2	99%
3	101%
4	96%
5	102%

[0072] 图 1b 是各种盐水混合物的剩余的酶活性并且图表显示上面的表 6b 结果的图表。添加的盐对酶的稳定性没有明显的影响。因此,据信氯是天冬酰胺酶活性损失最重要的因素。

[0073] 例 7

[0074] 具有最初相等的天冬酰胺酶活性的两份溶液用去离子水 (试验 1) 和自来水 (试验 2) 同样地稀释以制备第一天冬酰胺酶溶液和第二天冬酰胺酶溶液。每种溶液在室温被

放置 30 分钟并且随后每种天冬酰胺酶溶液被添加至玉米湿润粉糊。在酶被添加至湿润粉糊之后的 5 分钟和 10 分钟测量湿润粉糊中的天冬酰胺酸,并且测量值在下面的表 7 中显示。

[0075] 表 7. 使用混合在饮用水和去离子水中的酶的玉米湿润粉糊中的天冬酰胺酸含量
[0076]

用于酶稀释液中 的水的类型	湿润粉糊样品	天冬酰胺酸 (ppm)
去离子水	首次添加天冬酰胺酶溶液之后的 5 分钟	3.6
去离子水	首次添加天冬酰胺酶溶液之后的 10 分钟	2.9
来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水	二次添加天冬酰胺酶溶液之后的 5 分钟	37.2
来自美国, TX, Plano 的北德克萨斯州市政水区域的饮用水	二次添加天冬酰胺酶溶液之后的 10 分钟	24.2

[0077] 在上面的表 7 中显示的玉米湿润粉糊中的天冬酰胺酸的含量证明天冬酰胺酸的最终含量非常依赖于潜在的稀释过的天冬酰胺酶溶液。在上面显示的实施例,通过去离子水和饮用水处理之后的玉米湿润粉糊中的天冬酰胺酸的含量差别在大约一个数量级上。

[0078] 上面显示的数据清楚地显示了活性氯的含量必须被减少以使剩余的天冬酰胺酶的活性最大化。由于去离子水和蒸馏水很昂贵,本发明提供了通过选择性地去除和 / 或使饮用水或其它水源中的氯失活而使剩余的酶活性最大化的方法。

[0079] 可以使用本领域中已知的任何可以降低饮用水中的减少酶活性的成分的浓度的方法,包括但不限于,通过活性碳、吹脱法(以使氯挥发)、反向渗透系统和 / 或离子交换树脂过滤饮用水从而处理饮用水以降低减少活性的成分的浓度。还可以通过将饮用水与足量的去离子水或蒸汽水混合以降低减少活性的成分的浓度从而处理饮用水以制备稳定的酶溶液。

[0080] 在此使用的“清除剂”是通过与氯反应而保护酶活性的任何的添加剂。因此,可以将用于减少酶的成分的清除剂添加至饮用水。例如,在一个实施例中,将氯的清除剂 - 硫代硫酸盐添加至饮用水。此外,可以使用其它添加剂以使氯失活。例如,由于氯是强氧化剂,还可以将还原剂添加至饮用水与氯反应。氧化 - 还原化学中已知的还原剂是电子供体的那些化合物,而已知的氧化剂是电子受体。因此,在一个实施例中,可以将一种或多种还原剂(例如电子供体)添加至饮用水源中以使氯失活或中和氯。还原剂的例子包括但不限于氯化亚锡二水合物、亚硫酸钠、焦亚硫酸钠、抗坏血酸、抗坏血酸衍生物、异抗坏血酸(isoascorbic acid)(异抗坏血酸(erythorbic acid))、抗坏血酸衍生物的盐、铁、锌、亚铁

离子和其混合物。

[0081] 在一个实施例中,本发明将总氯浓度减少至 0 至低于 0.5ppm 之间,且优选 0 至 0.1ppm 之间的水平。

[0082] 在一个实施例中,随后天冬酰胺酶与处理过的水混合以制备稳定的天冬酰胺酶溶液并且随后所述天冬酰胺酶溶液可以与食品产品混合。在一个实施例中,饮用水被充分地处理并且在酶已经被添加至处理过的饮用水之后至少 30 分钟且优选至少 4 小时之后,当剩余的酶活性至少是 80% 且优选至少 90% 时形成稳定的酶或天冬酰胺酶溶液。在一个实施例中,对于所需要的时间,剩余的酶活性至少是 90% 以获得被混合至面团的天冬酰胺酶溶液。

[0083] 根据本公开,本领域的技术人员将可以证明并提供必要的水组分以获得所需要的剩余的酶活性。

[0084] 可以被添加所述天冬酰胺酶溶液的食品产品包括但不限于面团、泥浆和任何其它的需要减少丙烯酰胺含量的消费品中。例如,在一个实施例中,将天冬酰胺酶溶液添加至由马铃薯薄片制备的马铃薯泥浆中。在一个实施例中,马铃薯泥浆通过将天冬酰胺酶溶液添加至马铃薯薄片制作。在一个实施例中,天冬酰胺酶溶液用于添加的水并且被添加至面粉组分以制备面团。在一个实施例中,将天冬酰胺酶添加至玉米湿润粉糊。

[0085] 在一个实施例中,本发明包括一种提供可以被添加至具有天冬酰胺酸的食品成分中的稳定的天冬酰胺酶溶液的系统。在一个实施例中,所述系统包括处理水的处理系统。所述处理系统通过活性碳或使用上面列出的其它的去除方法可以去除例如氯的成分,并且所述处理系统可以提供添加剂,包括但不限于可以将天冬酰胺酶的活性提高至高于如果没有添加所述添加剂的水平的还原剂、氯清除剂或 EDTA。随后,处理过的水可以被传送至混合罐,在此天冬酰胺酶可以被稀释以制备稳定的天冬酰胺酶溶液。随后,天冬酰胺酶溶液可以被测量或被添加至使用的面团中以制备上面描述的加工食品或热加工食品。随后,面团可以被进一步地以本领域中已知的方法被加工(例如通过挤出和压片和热加工成型)。本领域的技术人员根据这些公开将理解本发明可以用于任何需要天冬酰胺酶溶液以减少食品产品中丙烯酰胺含量的地方。

[0086] 在一个实施例中,本发明包括一种系统,所述系统包括饮用水源和天冬酰胺酶源,处理系统可以将处理过的水中的天冬酰胺酶的活性提高至比没有经过处理过的水要高的水平,并且传送系统可以将处理过的饮用水和天冬酰胺酶混合。在一个实施例中,传送系统包括接收来自处理系统的处理过的水和天冬酰胺酶的混合罐。

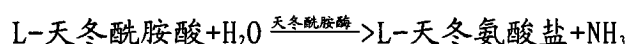
[0087] 确定本申请中的例子中天冬酰胺酶活性所使用的试验方法如下面显示:

[0088] I. 背景:

[0089] 对天冬酰胺酶活性的 SIGMA 过程使用 pH 值 8.6 的三羟甲基氨基甲烷缓冲液(Sigmacatalogue A 4887)。由于食品级天冬酰胺酶在 pH 值 8.6 时显示低活性,使用 MOPS(3-吗啉丙磺酸)将试验改变至 pH 值 7.0。

[0090] II. 原理:

[0091]



[0092] III. 条件:

[0093] $T = 37^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 7.0$, A_{436} , 光路 = 1cm

[0094] IV. 方法:

[0095] 分光光度测量法 (Spectrophotometric Stop Rate Determination)

[0096] V. 试剂:

[0097] a. 100mM 的 MOPS 钠盐 (3- 吗啉丙磺酸)。称出 2.09g 的 MOPS (Sigma M5162)。在室温溶解于 60mL 的 DI 水。添加氢氧化钠以将 pH 值调节至 7.0。使用 DI 水制成接近 100mL。在不使用时在冰箱中储存。

[0098] b. 189mM 的 L- 天冬酰胺酸溶液。称出 0.25g 的无水 L- 天冬酰胺酸, 并溶于 10mL 的 DI 水。在不使用时在冰箱中储存。在冷藏之后使用之前, 超声溶解天冬酰胺酸晶体。

[0099] c. 6mM 的硫酸铵标准溶液 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 标样)。在分析天平上称出 0.079g 的硫酸铵, 并标明称重至 0.0001g。将其用 DI 水溶解并制成接近 100mL 的体积。在不使用时在冰箱中储存。

[0100] d. 1.5M 的三氯乙酸 (TCA)。称出 2.45g 的三氯乙酸。用 DI 水溶解并制成接近 10mL 的体积。

[0101] e. 氨着色试剂: 氨氮试验试剂盒, 奈氏比色法, LaMotte 代码 3642-SC, VWR Cat. No. 34186-914。2 号试剂含有汞。

[0102] f. 天冬酰胺酶溶液: 在使用之前在室温的去离子水中直接制备含有 2.0-4.0 单位/mL 的天冬酰胺酶的溶液。如果酶是冷冻的, 在取一份用于稀释之前, 要在温水中完全解冻。对于典型的酶浓度, 0.1mL 的酶溶液可以被稀释至 50mL。

[0103] VI. 过程:

[0104] a. 对于样品瓶, 将微量恒温仪 (heating block) 设定至 37°C 。

[0105] b. 使用可调节的微量移液管将下面的试剂转移至样品瓶 (mL):

[0106]

试剂	试验	酶空白	标样 1	标样 2	标样 3	试剂空白
A (缓冲液)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
B (L-ASN)	0.10	0.10	---	---	---	---
C (铵标样)	---	---	0.25	0.50	1.00	---
DI 水	0.90	0.90	0.85	0.60	0.10	1.10
F (酶溶液)	0.10	---	---	---	---	---

[0107] c. 盖上样品瓶并放置在 37°C 的微量恒温仪中。开始摇动微量恒温仪。

[0108] d. 在 30 分钟之后从微量恒温仪中取出样品瓶。移开样品瓶的盖子, 立即添加 TCA 试剂并混合。随后, 将试剂 F (酶溶液) 添加至酶空白中。对于酶试验溶液, 从微量恒温仪至添加 TCA 之间的取出样品瓶之间的时间应该尽可能的短。在添加 TCA 之后, 测量氨之前的时间不是很重要。对于空白和标样, 从微量恒温仪至添加 TCA 之间的取出的时间不是很重要。

重要。

[0109]

试剂	试验	酶空白	标样 1	标样 2	标样 3	试剂空白
D (TCA)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
F (酶溶液)	---	0.10	---	---	---	---

[0110] e. 将 0.20mL 的每种溶液吸量至试管或样品瓶。添加 4.3mL 的去离子水、4 滴 LaMotte1 号试剂, 和 0.50mL 的 LaMotte2 号试剂。在 436nm, 1cm 比色皿中读取吸光率之前, 混合溶液并置于室温 10-20 分钟。用 DI 水将分光光度计调零。

[0111] VII. 结果的计算

[0112] f. 酶活性通过氨 (umole/0.2mL) 的标定曲线计算。

[0113] g. 计算步骤的说明。

[0114] i. 硫酸铵标准溶液浓度的计算 :

[0115] $\text{mM} = (0.0809\text{g}) * (1000\text{mM/M}) * (2\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{SO}_4) / ((132.14\text{g/mole}) * (0.1\text{L}))$

[0116] $= 12.24\text{mM} = \text{mmole/L} = \text{umole/ml}$

[0117] 其中 0.0809 是标准硫酸铵的重量

[0118] ii. 计算 2.2mL 的标样中的 NH_3 的 umole :

[0119] $2.2\text{mL 中的 } \text{NH}_3 \text{ 的 umole} = (\text{NH}_3 \text{ 的 umole} / \text{标准溶液的 mL}) * (\text{标样的 mL})$

[0120] iii. 计算 $\text{NH}_3/0.2\text{mL}$ 的 umole :

[0121] $\text{NH}_3/0.2\text{mL 的 umole} = (2.2\text{mL 中 } \text{NH}_3 \text{ 的 umole}) * (0.2\text{mL}) / (2.2\text{mL})$

[0122] iv. 用 $x = A_{436}$, $y = \text{NH}_3 \text{ umole} / 0.2\text{mL}$ 计算回归曲线

[0123] v. 由标定曲线, 计算 $\text{NH}_3/0.2\text{mL}$ 的 umole :

[0124] $\text{NH}_3/0.2\text{mL 的 umole} = (\text{斜率}) * (A_{436}) + \text{截距}$

[0125] vi. 使用下面的公式计算稀释过的酶溶液的活性 :

[0126] $\text{单位 /mL 酶} = (\text{所释放的 } \text{NH}_3 \text{ 的 umole}) * (2.20) / (0.2 * 30 * 0.1)$, 其中 :

[0127] $2.20\text{mL} = \text{步骤 1 的体积 (步骤 1 是酶试验溶液)}$

[0128] $0.2\text{mL} = \text{步骤 2 中使用的步骤 1 的体积 (步骤 2 是显色反应)}$

[0129] $30 \text{ 分钟} = \text{以分钟计算的试验时间}$

[0130] $0.1\text{mL} = \text{使用的酶的体积}$

[0131] vii. 稀释因子是 50mL 除以被稀释至 50ml 的浓缩的酶的体积。

[0132] viii. 稀释之前酶溶液的浓度 = (稀释过的溶液的单位 /mL) * (稀释因子)

[0133] 虽然本发明已经参照多个实施例进行了具体说明和描述, 但是本领域的技术人员应当知道在不背离本发明的思想和范围的情况下是可以进行保持溶液中的剩余的天冬酰胺酶活性的各种其它的方法。

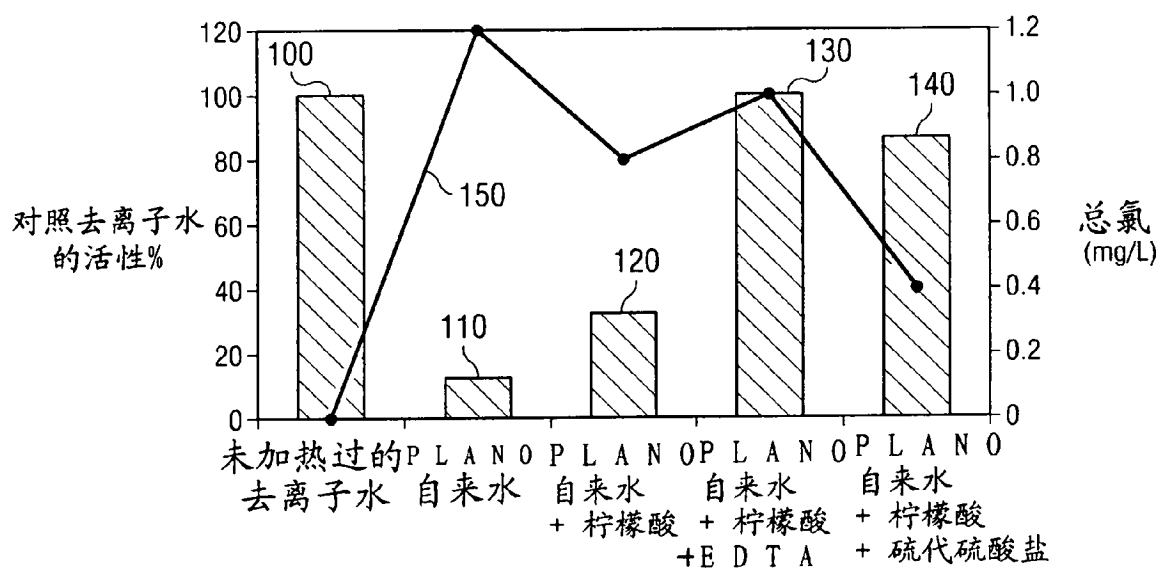


图 1A

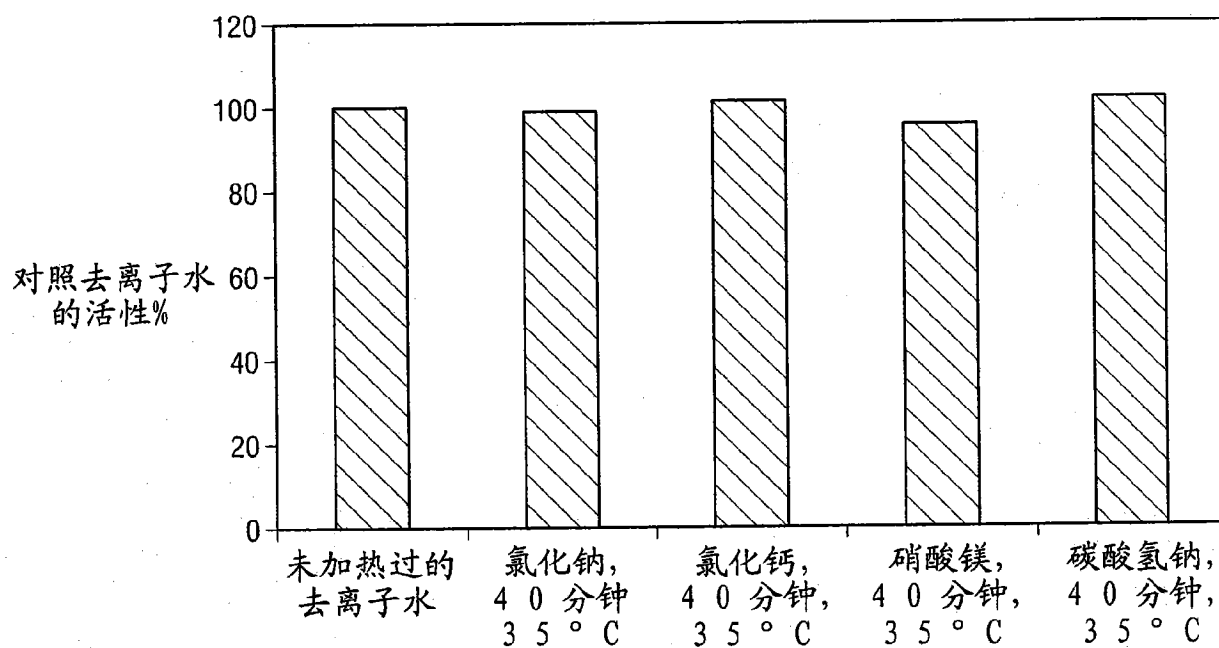


图 1B