

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-521653

(P2004-521653A)

(43) 公表日 平成16年7月22日(2004.7.22)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
A 2 3 J 3/10	A 2 3 J 3/10	2 B 1 5 0
A 2 3 J 3/34	A 2 3 J 3/34	4 B 0 1 7
A 2 3 K 1/16	A 2 3 K 1/16 3 0 4 A	4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/30	A 2 3 L 1/30 A	
A 2 3 L 2/52	A 2 3 L 2/00 F	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)

(21) 出願番号	特願2003-513349 (P2003-513349)	(71) 出願人	503206215
(86) (22) 出願日	平成14年7月18日 (2002. 7. 18)		デーエスエム イーペー アセツツ ベス
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月19日 (2004. 1. 19)		ローテン フェンノートシャップ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/008072		オランダ 6 4 1 1 テーエー ハールレ
(87) 国際公開番号	W02003/007730		ン ヘット オーフェルローン 1
(87) 国際公開日	平成15年1月30日 (2003. 1. 30)	(74) 代理人	100082005
(31) 優先権主張番号	01202749.6		弁理士 熊倉 禎男
(32) 優先日	平成13年7月18日 (2001. 7. 18)	(74) 代理人	100084009
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 小川 信夫
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		(74) 代理人	100093300
			弁理士 浅井 賢治
		(74) 代理人	100114007
			弁理士 平山 孝二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミルクタンパク質の加水分解の方法

## (57) 【要約】

本発明は、加水分解されたミルクカゼインと、好ましくは加水分解されていない乳清タンパク質とを、9 : 1 ~ 1 : 1 の比(乾燥質量)で含む組成物を提供する。40 g / リットルの量で10 で水に溶解され又は存在する場合、これは、pH 4 で透明な液体である。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

水に 40 g / リットルの量で 10 で溶解され又は存在する場合、pH 4 で透明な液体である、加水分解されたカゼインタンパク質と乳清タンパク質とを、乾燥質量で 9 : 1 ~ 1 : 1 の比で含むことを特徴とする組成物。

## 【請求項 2】

乳清タンパク質画分が加水分解されていない、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

加水分解前のタンパク質組成物と比較して低下したアレルギー性を有する、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

5000 ダルトン未満の分子量を有する加水分解されたタンパク質のペプチド画分が、加水分解されたタンパク質中に存在するタンパク質の 90 質量% より大きい、好ましくは、95 質量% より大きい、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 5】

1500 ダルトン未満の分子量を有する加水分解されたタンパク質のペプチド画分が、加水分解されたタンパク質中に存在するタンパク質の 80 質量% より大きい、好ましくは、85 質量% より大きい、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

スキムミルクがタンパク質源として使用される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

組成物 1000 g 当たり 10 ~ 150 の全タンパク質乾燥質量を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 8】

10 % w/w 未満、好ましくは 5 % w/w 未満の水を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物を含む食料品、好ましくは飲料。

## 【請求項 10】

スポーツドリンク又はソフトドリンク又は健康ドリンクである、請求項 9 の飲料。

## 【請求項 11】

加水分解されたカゼインタンパク質と乳清タンパク質とを含む組成物の調製方法であって、少なくともカゼインタンパク質を加水分解して、水に 40 g / リットルの量で 10 で溶解され又は存在する場合に pH 4 で透明な液体である組成物とすることを含み、カゼイン及び乳清タンパク質画分が、乾燥質量で 9 : 1 ~ 1 : 1 の比で存在することを特徴とする方法。

## 【請求項 12】

乳清画分及びカゼイン画分が加水分解される、請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

カゼイン及び / 又は乳清画分が、エンドプロテアーゼ、好ましくはプロリン特異性エンドプロテアーゼによって加水分解される、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

さらに、プロリン特異性エンドプロテアーゼでの加水分解を含み、プロリン特異性エンドプロテアーゼ加水分解が、他のエンドプロテアーゼの前、後又は同時に行われる、請求項 11 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 14】

エンドプロテアーゼ加水分解と同時又は後に、エキソプロテアーゼを加える、請求項 11 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 15】

10

20

30

40

50

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物の食品又は餌への使用。

【請求項 1 6】

加水分解していないタンパク質と比較して、食品又は餌中のタンパク質のアレルゲン性を減少し又は生理活性を向上するための、食品又は餌への請求項 1 4 の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、加水分解されたミルクカゼイン及び好ましくは、加水分解されていない乳清タンパク質を含む組成物に関し、特に、加水分解されたカゼイン及び好ましくは加水分解されていない乳清タンパク質を含む加水分解物の新規製造方法に関する。結果として、このような加水分解物は、スポーツドリンク及びソフトドリンクのような飲料、栄養製品、乳児栄養物又は種々の食品若しくは発酵製品の製造に使用され得る。

10

【0002】

(本発明の背景)

ウシのミルクのタンパク質画分は、健康に結びつく。健康促進特性は、このタンパク質画分の栄養面のみならず、種々の健康促進要素に存在する。

ミルクタンパク質は、約 80% がカゼインからなる。残りのタンパク質は、種々の乳清タンパク質からなる。カゼイン画分は、アミノ酸、カルシウム及びホスフェートの主源であり、これら全ては、若い動物の成長に必要である。乳清タンパク質画分は、さらに、アミノ酸の源であり、加えて、これは、いくつかの生理活性で推定される健康促進タンパク質、例えば、免疫グロブリン、葉酸(folate)結合性タンパク質、ラクトフェリン、ラクトペルオキシダーゼ及びリゾチームを含む。これは、更に、カゼイン及び乳清タンパク質画分の代謝(metabolisation)において、多数の新しい生理活性特性が形成されることが知られている。このような新規に形成された生理活性特性の例は、カゾモルフィン、カソキニン(casokinins)、免疫グロブリン、免疫ペプチド、カゼインホスホペプチド、乳糖及びラクトフェリンを含む。従って、カゼインと乳清タンパク質とをミルクで生じるような組み合わせで使用すると、かなりの栄養及び健康の利点を与える。

20

最近、産業的に調製されたミルクタンパク質の加水分解物は、新規に形成された生理活性ペプチドを含み、特に、高血圧症と戦うACE-阻害剤を含むことが見出された。

ミルクの白い見かけは、脂肪小球とカゼインミセルによる光の散乱によって起こる。スキムミルク、即ちすべての脂肪が除去されたミルクは、これらカゼインミセルのために依然として白い。

30

【0003】

ミルクの乳清タンパク質画分、即ち脂肪及びカゼイン画分の双方を除去した後のミルクは、黄色みがかっているが透明なタンパク質溶液であり、これは、種々のタンパク質、ペプチド、ラクトース、ミネラル及びビタミンに富む。これらの成分の全ては、酸性条件下でさえも完全に溶解性である。それにもかかわらず、乳清タンパク質の溶解は、スプレードライの間、部分的な変性の結果として濁った溶液を生成し得る。部分的な酵素加水分解は、これらやや変性したスプレードライ乳清タンパク質の溶解特性を改善し得る。さらに、乳清タンパク質の徹底的な酵素加水分解は、さらに、その溶解性を改善するだけでなく、苦み及び遊離アミノ酸の存在のレベルを適度に増加する。乳清タンパク質の更に徹底的な酵素加水分解の通常目的は、アレルゲン性の低下と、腸の取り込みの改善を達成することにある。特に、低下したアレルゲン性の特徴は、商業的に重要である。例えば、北欧の異なる国において、乳牛ミルクの不耐性は、幼児の全体人口のほぼ 3% が、人生の最初の 2 年間で診断されている。 - ラクトグロブリンは、カゼインと共に、ウシのミルクにおける主なアレルゲンに属する。大人はめったにウシミルクアレルギーを示さず、このグループに対して特化した製品は、容易に吸収され得、良好な味を提供し、良好な棚安定性を示し、特に酸性条件下においてそうであるように仕立てられなければならない。従って、臨床、栄養、スポーツの用途並びに幼児栄養向けの乳清加水分解物の徹底的な酵素消化に関する多数の文献が存在することは、驚くべきことではない。

40

【0004】

50

乳清と対照的に、カゼインは、疎水性アミノ酸に富み、この加水分解物は、苦くて有名であり、悪臭及びだし汁の腐った味(off-taste)を有する傾向がある。これらの極端な苦味のため、酵素的に加水分解したカゼインは、限定的な用途のみしか見いだせない。さらに、疎水性アミノ酸の高い含有量は、カゼイン由来ペプチドを、特に酸性条件下で溶解困難とする。

文献に記載された部分的なカゼイン加水分解物の調製方法は、一般的に、いくつかのエンドプロテアーゼでの多段階加水分解と、その後1以上のエキソプロテアーゼでのインキュベーションを含む。種々のエンドプロテアーゼの組み合わせは、可能性あるアレルゲン性の反応を最小限にし、かつ、溶解性を改善するために要求される高加水分解度(高DH)を得るために一般的に使用される。続くエキソプロテアーゼでのインキュベーションは、アミノ又はカルボキシ末端アミノ酸残基を放出して苦い腐った味を最小限にする。しかしながら、遊離アミノ酸を放出することは、収率の損失及び減少した栄養価を意味する。高レベルの遊離アミノ酸は、更に、だし汁の腐った味となり、最終加水分解物の浸透圧値が増加するので、遊離アミノ酸、及び苦い腐った味の原因となる強い疎水性ペプチドを除去するための追加の処理工程は、一般的な方法である。

10

20

30

40

50

#### 【0005】

特許出願EP 0610411は、低分子量ペプチド及び15～35%の大きさのDH値を有する良好な感覚受容性の品質の完全に溶解性のカゼイン加水分解物を開示する。

特許出願WO 96/131744は、ミルクタンパク質加水分解物の調製方法であって、加水分解反応が、バシラスからの中性又はアルカリ性プロテアーゼを、エンド及びエキソペプチダーゼを含むアスペルギルス酵素複合体との組み合わせで含み、加水分解度が35～55%である方法を開示する。

特許出願EP 384303は、低い苦味と低いDH値を示すタンパク質加水分解物のアミノペプチダーゼを用いる調製方法を開示する。

特許出願EP 223 560は、連続的な酵素加水分解を用いたミルクタンパク質の調製方法を開示する。

特許出願EP 0631731は、乳清タンパク質及びカゼインを含むタンパク質混合物の部分的加水分解物であって、該加水分解物が、4～10%の加水分解度を有し、低苦味加水分解物がトリプシン及びキモトリプシンの組み合わせを使用して得られることを開示する。

米国特許第4,600,588号は、a.o.酸真菌プロテアーゼで処理した酸沈殿カゼインからなるミルクタンパク質加水分解物を開示する。

特許出願JP11243866は、無味無臭で、17～30%の加水分解度を有する、飲料及び食品に有用なカゼイン加水分解物を開示する。

#### 【0006】

(本発明の概要)

本発明は、加水分解されたカゼインタンパク質と乳清タンパク質とを、乾燥質量で9:1～1:1の比で含むタンパク質組成物を提供する。好ましくは、乳清タンパク質は、加水分解されていない。加水分解カゼインタンパク質及び乳清タンパク質が、水に10でタンパク質(乾燥質量)40g/リットルの量で溶解され又は存在する場合、タンパク質組成物は、pH4で透明な液体である。

タンパク質組成物がタンパク質(乾燥質量)を40g/リットルより少なく含む場合、この組成物は、タンパク質(乾燥質量)40g/リットルの液体に濃縮された場合、10においてまだ透明液体である。

本発明は、更に、少なくともカゼイン画分が加水分解されている、カゼインタンパク質及び乳清タンパク質を含む組成物の調製方法を提供する。

本発明は、更に、本発明の組成物を含む製品、例えば、スポーツドリンク又はソフトドリンク又は健康ドリンクのような飲料、若しくは、高齢者用又は体重を減らしている人用の製品のような栄養食品、若しくは、期間又は後続製品(term or follow-on product)のような幼児用調合乳(infant formula)を提供する。さらに、これは、発酵した製品であり得、又は、種々のパーソナルケア製品に混合され得る。

## 【0007】

(本発明の詳細な説明)

本発明の製品は、好ましくは、乳清タンパク質及びカゼインを、ウシのミルクに存在するような比率で含む。ペプチド及びタンパク質に存在する生理活性の利点を得るため、好ましくは、乳清タンパク質の酵素加水分解を最小にするべきである。カゼインの酵素加水分解をかなり十分として、酸条件下での透明な製品における高いタンパク質収率を保証すべきである。従って、カゼインタンパク質は、十分な量の酵素で、十分な時間加水分解され、ほとんど完全に加水分解されたタンパク質になる。ほとんど完全に加水分解されたことは、ほんのわずかなパーセントのカゼイン塩が完全には溶解できず、最終加水分解物においていくらか濁度を引き起こし得ることを意味する。同様に、乳清画分は、いくらかの残りの不溶性物質、例えば、痕跡量のカゼインを含み得る。この不溶性物質をカゼイン加水分解物及び乳清の混合物から除去するために、低速遠心分離(例えば、2000~5000g)又は単純な沈降と続くデカンテーションのいずれかが、産業上許容できる処理工程を提供し、透明な製品が得られる。通常、乳牛ミルクは、低速遠心分離又は沈降/デカンテーション工程のいずれを使用しても浄化され得ないことが理解されるべきである。加水分解されたカゼインタンパク質と乳清タンパク質を混合した後、好ましくは低速遠心分離をし、得られる製品は、リットル当たり40gのタンパク質(乾燥質量)の量で水に溶解し又は存在させた場合、pH4で透明な液体を生成した。通常、加水分解は、3.5~9のpH、及び40~80の温度で行われる。好ましくは、タンパク質加水分解物は、ウシのミルク中に存在する乳清対カゼインの比を有し、酸条件下で透明である。好ましくは、加水分解物は、改善されたはっきりしない(neutral)又は薄い(bland)味を有し、及び良好な棚安定性を有する。

10

20

## 【0008】

液体組成物は、10及びpH4の場合、「透明」であり、480ナノメートルで、1cmガラスセルを使用して測定したその光吸収は1.00より低く、20000gで20分間遠心分離の後に得られる同じ組成物の上澄みに対して10及びpH4で測定した場合、好ましくは0.50より低い。

本発明は、ミルクタンパク質の混合物、好ましくは、カゼイン加水分解物及び乳清を、カゼイン対乳清の比で9:1~1:1の乾燥質量、好ましくは、ウシのミルク中に存在するような比率で提供する。さらに、本発明は、そのような混合物及びそこから由来する栄養飲料の調製方法を提供する。タンパク質加水分解物は、幼児用調製乳、治療食、栄養品(nutraceutical)、アイスクリーム、ドレッシング、発酵製品、ヨーグルト、及び個人ケア製品に使用され得る。一般に、本発明の組成物は、ウシのミルクと比較して非常に低いアレルギー性を有する。一般に、本発明の組成物は、薄い又ははっきりしない味、並びに酸性条件下での改善された溶解性及び透明性(transperancy)を有し、他の飲料、例えば、スポーツドリンク又はソフトドリンク又は健康ドリンク又は発酵製品のベースとして使用され得る。薄い味の語は、蒸留水に溶解したキナーゼサルフェートの15mg/リットルのレベルと同様又はそれ以下であり、及び14の温度で味がわかる苦味のレベルを意味する。

30

## 【0009】

本発明の製品の健康利益をさらに改善するために、タンパク質組成物は、ビタミン濃縮物、フルーツ又はフルーツ画分と組み合わせられて、最終生成物のビタミン及び繊維含有量を向上させ、及び、加水分解物画分とも組み合わせられて生理活性タンパク質のレベルを向上させ得る。さらに、本発明の製品は、種々の微生物培養で発酵されて、味を改善し、健康利益を改善し、又は最終製品の粘度を向上し得る。理想的に、発酵は、40~50の温度でのプロリン特異性エンドプロテアーゼのインキュベーションと同時に進行される。使用したスターター培養が高い粘度を発生する場合、発酵は、低速遠心分離工程の後に最善に行われる。好適なスターター培養又は種々のスターター培養の組み合わせでのインキュベーションに続き、全体の混合物は、要求された酸pHが達成されるまで発酵され、その後10~20に冷却される。従って、このように生産された発酵されたベースは、水又は

40

50

ジュースに均質化され又は希釈され、4 に冷却され、要求された小売コンテナに充填され得る。すなわち、低温殺菌又は滅菌工程はあってもなくてもよい。医薬を必要としない消費者の間で受け入れられる広範な消費者を得るために、高い嗜好性並びに酸条件下で溶解性であるような一定の物理化学的特徴は、最も重要である。透明で白くない見かけは、重要な利益であるとともに、通常乳製品に付随するジアセチルのような臭い及び香りが無い。従って、本発明は、酸条件下で透明な液体であって、ウシのミルクと比較して低いアレルギー性を有し、ミルクの健康促進特性及び栄養効果を有する液体を調製する方法であって、炭酸飲料を含む飲料、発酵製品及び食品のような食品用途に使用され得るものを提供する。

#### 【0010】

本発明の加水分解物の調製方法は、スキムミルク、スキムミルクパウダー、ミルクタンパク質濃縮物、乳清タンパク質とカゼインとの好適比混合物、又は、単離された乳清タンパク質画分及び単離されたカゼイン画分を使用することによって行われてもよく、これらは、その後、混合して出発物質として好ましい比を得、画分(の一部)を加水分解した後に混合してもよく、加水分解中に混合してもよい。

乳清タンパク質は、チーズ製造から得られた液体乳清を出所としてもよく、好ましくは、動物又は微生物レンネットによるカゼインの凝固に起因するような甘い乳清を出所としてもよい。これは、さらに、混入しているカゼインから、例えば、酸性化されてその後遠心分離されて精製される。好ましくは、濃縮され、スプレードライされないバージョンのこれら乳清製品が使用される。任意に市販の乳清タンパク質パウダーは、例えば、BiPRO(Da visco Foods International)、PROXIME 660又はHIPROTAL 875又はDOMOVICTUS 535(BDI, オランダ)又は、より好ましくはこれらのスプレードライされない同等物を使用してもよい。任意に、使用される乳清は、非タンパク質分解性酵素、例えば、ラクターゼにかけて、存在するラクトースをグルコース及びガラクトースに変えてもよい。任意に、乳清物質は脱塩されてもよい。本発明は、好ましくは、乳清タンパク質画分の加水分解をせず、又は非常に限られた加水分解だけを考える。加えて、本発明は、乳清画分及びカゼイン画分の双方が、例えばスキムミルク又はスキムミルクパウダーの加水分解の間に生じるように加水分解されるような加水分解物を考える。スキムミルクは、脱脂されたミルクであり、従って、好ましくは1g/リットルより少ない脂肪、好ましくは、0.8g/リットルより少ない脂肪を含む。スキムミルク又はスキムミルクパウダーを出発物質として使用する本発明の製品において、1500ダルトン未満の分子量を有するペプチド画分は、典型的に、本発明の組成物中に存在するタンパク質の85質量%より大きいことを示すに対し、5000ダルトン未満のペプチド画分は、典型的に、本発明の組成物中に存在するタンパク質の95質量%より大きいことを示す。従って、本発明の製品は、好ましくは、出発タンパク質と比較して著しく減少したアレルギー性を示す。本発明は、更に、ナノ濾過し、イオン交換し、又は電気透析した後に得られるような、低下した浸透圧値を有する加水分解物を考える。

#### 【0011】

カゼイン画分の透明性及び酸溶解性は、カゼインミセルをより小さなペプチドに酵素的に加水分解することによって得ることができる。

カゼイン源は、レンネットカゼイン、酸カゼイン、又はカゼインナトリウム、カルシウム若しくはカリウムのいずれかであり得る。本発明の方法に対し、タンパク質は、1リットル当たり10~150グラムのタンパク質(1~15%w/w)、好ましくは、1リットル0~60グラムのタンパク質を含む溶液中に希釈され又は元に戻される。

部分加水分解物を得るために、タンパク質は、まず、4~10のpH最適条件でエンドプロテアーゼにかけられ、嵩高い疎水性アミノ酸残基のカルボキシ末端側でタンパク質を切断することを優先する。好ましくは、エンドプロテアーゼは、エキソプロテアーゼがない。

このような特徴を有する好ましいエンドプロテアーゼは、サブチリシン(EC3.4.24.4又はペスカラーゼ(Pescalase)、(DSM Food Specialities、Seclin、フランスによって供給)、

10

20

30

40

50

又はアルカラーゼ(Alcalase), (NOVO, Bagsvaerd, Denmarkによって供給)), サーモリシン(EC3.4.24.4又はサーモアーゼ(ダイワカセイ、大阪、日本によって供給)), 中性メタロプロテアーゼ(EC3.4.24.28又はブリューワーズプロテアーゼ2000(Brewers Protease 2000))(DSM Food Specialities, Seclin, フランスによって供給)、又はニュートラーゼ(Neutralase), (NOVOによって供給))又はキモトリプシン(EC3.4.21.1)である。他の好ましいエンドプロテアーゼは、プロリン特異性エンドプロテアーゼである。プロリン特異性エンドプロテアーゼは、プロリンのアミノ末端側又はカルボキシ末端側のいずれかで優先的な切断を示し得る。プロリンのアミノ末端側で切断し得るエンドプロテアーゼは、既知である(Nature, Vol. 391, 15 January 15, pp301-304, 1998)。プロリンのカルボキシル末端側で切断することを優先するエンドプロテアーゼも既知である(EC3.4.21.26)。後者のタイプのプロリン特異性エンドプロテアーゼは、好ましくは、食品グレード過剰産生組換え株、例えば、アスペルギルス(Aspergillus)から得られる。この酵素の好適な産生株の例は、同時継続特許欧州出願番号PCT/EP01/14480に記載されている。このプロリン特異性エンドプロテアーゼは、プロリン残基を含有するペプチド結合のみを加水分解し、この酵素は、好適なエンドプロテアーゼの一つと有利に結合して、結合した乳清タンパク質とカゼイン又は単離した画分を加水分解し得る。プロリン特異性エンドプロテアーゼを使用する重要な利点は、カゼイン及び乳清タンパク質中の主要なアレルギー性のエピトープを切断し得ることである。例えば、カゼインは、プロリン残基に非常に富むので、プロリン特異性エンドプロテアーゼによって頻繁に切断され得る。 - ラクトグロブリンの3つの主要なアレルギー性エピトープ(フラグメント41-60, 102-124及び149-162; Clinical and Experimental Allergy, 1999, Vol 29, pp1055-1063)は、全てセントラルプロリン残基を含むので、エンドプロテアーゼでのインキュベーションは、関連するヒトIgEによる認識を低下しやすくなり、この結果、最終製品のアレルギー性が最小になる。本発明の方法の好ましい態様は、カゼイン画分若しくは乳清画分とカゼイン画分の双方が少なくともプロリン特異性エンドプロテアーゼを含む加水分解にかけられることである。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

本発明の方法の他の好ましい態様は、全体のミルクに存在するような、乳清画分、カゼイン画分又はタンパク質画分の酵素加水分解が、エンドプロテアーゼのみを使用して、すなわち、エキソプロテアーゼを使用せずに加水分解されることである。

プロリン特異性エンドプロテアーゼのpH最適条件に依存して、加水分解は、他のエンドプロテアーゼとともに又は他のエンドプロテアーゼとは別に行われる。加水分解は、一定pH又は非制御pH条件下で行われ得る。好ましくは、加水分解は、2つの工程で行われ、まず、タンパク質を、中性又はアルカリ性条件下、エンドプロテアーゼによって、嵩高い疎水性のアミノ酸残基のカルボキシル末端側でタンパク質を切断することを優先してインキュベートする。この加水分解の間、pHは、酸性の値(すなわち、pH7未満)に低下し、そうなるからのみ、第2のエンドプロテアーゼ、好ましくは、プロリン特異性エンドプロテアーゼ、より好ましくは、アスペルギルスから得られたプロリン特異性エンドプロテアーゼを加える。

#### 【0013】

所望程度の加水分解を達成するために必要な酵素の量は、使用される酵素に依存する。しかしながら、酵素投与量及びインキュベーション条件は、カゼインタンパク質画分の大部分が典型的に6~20時間のインキュベーション期間の後、反応の水相中に溶解されるといった方法で最適化される。大部分とは、pH4下、カゼイン画分中に存在する20%より少ない、好ましくは10%より少ない、より好ましくは5%より少ないタンパク質が、10分間、2000gでの遠心分離で沈殿され得ることを意味する。

エンドプロテアーゼでのインキュベーションに起因する加水分解物の追加の苦味除去は、有益であり得る。追加の苦味除去は、好ましくはエンドプロテアーゼ活性のないエキソプロテアーゼ製剤による同時又は後のインキュベーションによって好適に行われる。インキュベーションがエンドプロテアーゼでのインキュベーションの後に行われる場合、塩酸でのpH調整が必要であり; エンドプロテアーゼのインキュベーションは、普通要求されな

い。苦味除去は、中性又はわずかに酸性の条件下で、アミノ末端疎水性アミノ酸残基、例えば、アクセリザイム(Accellerzyme)(DSM Food Specialities: Delft, オランダ)又はコロラーゼLAP(Corrolase LAP)(Rohm, Darmstadt, ドイツ)又はバチラス ステアロサーモフィルス(Bacillus stearothermophilus)から及びStollら(BBA 438(1976) 212-220)によって記載されたように単離されたAPIIを除去することを優先することを示す好適なアミノペプチダーゼで行い得る。これとは別に、苦味除去は、わずかに酸性の条件下、カルボキシ末端疎水性アミノ酸残基、例えば、アスペルギルスからのCPDI (PepG) (Dal Degan et al, Appl. Environ Microbial, 58(7)2144-2152)を除去することを優先することを示す好適なカルボキシペプチダーゼで行われ得る。任意に、2つのタイプのエキソプロテアーゼの組み合わせは、わずかに酸性の条件下で使用され得る。エンドプロテアーゼ並びにエキソプロテアーゼに対する好ましいインキュベーション温度は、40 又はそれ以上、好ましくは、50 ~ 80 である。

10

#### 【0014】

加水分解の条件とは関係なく、最終加水分解物は、好ましくは、酵素不活性化の追加の工程を受ける。酵素不活性化工程は、少なくとも85 に少なくとも10分間加熱することを含む熱処理であり得る。より高い温度又はより極端なpH値を使用すれば、期間がより短くなり得る。そのような熱処理は、好ましくは、酸性pH値、好ましくは3~7で行われる。全ての非可溶化物質を最終製品から除去するため、デカンテーション又は工業的スケールで行われ得るような低速、例えば、2000~4000gの遠心分離が好適である。任意に、加水分解物は、ウルトラフィルター、マイクロフィルター、珪藻土、ファイバーグラス 20  
フィルターを使用して、又は、交流濾過を使用して濾過され得る。完全な酵素不活性化は、色素ゼラチンテストによって確認され得る。任意に、濾過された最終加水分解物は、活性炭、ナノ濾過、イオン交換又は電気透析で処理されて、余剰の塩を除去し得る。濾過された加水分解物は、低温殺菌され、滅菌され、必要であれば、さらに乾燥技術、例えば、蒸発、ナノ濾過、スプレードライ、流動床乾燥又はこれらの組み合わせによって濃縮される。好ましくは、得られた製品は、粒状形態である。

20

#### 【0015】

有利に、カゼインと乳清タンパク質の比は、実質的にウシのミルクで存在するものである。乳清タンパク質は、好ましくは、非加水分解タンパク質である。

有利に、カゼイン又は乳清タンパク質又はこの2つの組み合わせは、エンドプロテアーゼ 30  
のみを使用して、即ち、エキソプロテアーゼの使用を含まずに加水分解される。

好ましくは、最終タンパク質混合物は、10~50%の乳清タンパク質及び90~50%のカゼインを含む。より好ましくは、このタンパク質混合物は、20~40%乳清タンパク質及び80~60%カゼインを含む。カゼインと乳清タンパク質のパーセントは、共に乾燥質量ベースで表される。

本発明の好ましい態様において、カゼイン塩は、好適なエンドプロテアーゼで加水分解され、その後、プロリン特異性エンドプロテアーゼでインキュベーションを受ける。そのまま、又は好ましくは遠心分離の後、カゼイン加水分解物を濃縮し、乾燥する。乾燥した製品は、非加水分解乳清中に再び溶解され、所望のタンパク質濃度及びタンパク質比を得ることができ、その後必要であれば、遠心分離又は濾過され、及び低温殺菌され又は滅菌 40  
されて、本発明の製品を得ることができる。これとは別に、濃縮されたカゼイン加水分解物は、濃縮された非加水分解乳清タンパク質と混合され、所望のタンパク質濃度及びタンパク質比を達成し、その後、任意に遠心分離され又は濾過され、及び任意に低温殺菌され又は滅菌されて本発明の製品を得ることができる。

当然、本製品は、追加の酵素処理、たとえば、ラクターゼを受け、又は異なるタイプのスターター培養で発酵され、又は全ての種類の成分、例えば、フルーツ濃縮物、香料、顔料、アルコール、二酸化炭素、増粘剤、酸味料、酸化防止剤、ハーブ又はハーブ抽出物、健康促進化合物様ビタミン又はプロビタミン、又は生理活性ペプチド又は炭水化物又はアミノ酸と組み合わせて、市場の要求に沿った製品を処方することができる。

pH値が一般的に3より高く、好ましくは、3.5より高く、全タンパク質濃度が5% w/ 50

wより小さく、好ましくは3.5% w/wである最終用途において、480 nmで測定した溶液(40 g/リットルのタンパク質を含む)の光吸収は、1.000より小さく、好ましくは溶液の上澄みに対して測定して0.50より小さく、これは、20,000gで20分間遠心分離した後、1 cmガラスセルを10 かつpH 4で使用して得られる。

## 【0016】

## (実施例1)

プロリン特異性エンドプロテアーゼを使用するカゼインの加水分解  
カゼインナトリウムパウダーのkg当たり、サーモリシン1gのインキュベーションにより、1リットル当たりカゼインナトリウム(Miprodan 30、MD Foods, Viby, デンマークから供給)60gを含む溶液/懸濁液中、pH 6.7で75、一定pH条件で3時間後、  
ほとんど沈殿物のない透明な溶液になった。pHを5.0に調節した後、酵素を95で  
45分間インキュベートした。液体は冷却され、非常に苦味を与える味がした。pHを6  
.0に調節し、A.ニガー(A. niger)からのプロリン特異性エンドプロテアーゼ3単位をこ  
のカゼイン塩加水分解物25mlに加えた。A.ニガーからのプロリン特異性エンドプロテ  
アーゼの1活性単位は、1分間当たり1μモルのpNAをN-カルボベンゾキシ-グリシ  
ン-プロリン-pニトロアニリド(Z-Gly-Pro-pNA)(Bachem, スイス)からpH 5及び3  
7で遊離するのに要求される酵素の量として定義される。pNAの遊離は、410nm  
での光吸収によって測定される。50で終夜インキュベーションした後、pHを更に5  
.0に調節し、他の酵素不活性化工程(90で30分)を行った。室温に冷却した後、カ  
ゼイン加水分解物は、完全に溶解され、透明である。

## 【0017】

試験は、苦みが全くないことを示した。

P4000ポンプ(Thermoquest, Breda, オランダ)を取り付けたイオントラップマススペクトロ  
メーター(Thermoquest, Breda, オランダ)を使用するHPLCを、酵素インキュベーションに  
よって生産されたようなカゼインペプチドの分子量分布を特徴づけるために使用した。形  
成するペプチドは、PEPMAP C18 300A(MIC-15-03-C18-PM, LC Packings, アムステルダム  
、オランダ)カラムを、溶出に対してミリQ水(Milli Q water)中0.1%ギ酸(Millipore,  
bedford, MA, USA; 溶液A)及びアセトニトリル中0.1%ギ酸(溶液B)の勾配で使用し  
て分離した。勾配は、溶液A 100%で開始し、及び45分間で溶液B 70%に増加し、  
後者の比を更に5分間維持した。50μlの導入容積を使用し、流速は50μl/分とし  
、カラム温度を30に維持した。導入した試料のタンパク質濃度は約50μg/mlだ  
った。得られたデータに従い、カゼインペプチドの多くは、300~1200Dの範囲の  
分子量を有していた。

## 【0018】

## (実施例2)

加水分解していない甘い乳清で大規模に加水分解されたカゼイン塩を混合することによ  
って得られる透明で苦味のないミルク様ドリンク  
カゼインナトリウムを60g/リットル含む溶液(Miprodan 30, MD Foods, Viby, デンマ  
ークから供給)200mlに対し、サーモアーゼ(14000PU/mgの活性を有するバチラス  
サーモプロテオリチカス ロッコ(Bacillus thermoproteolyticus Rokko)からの熱安定性  
メタロエンドプロテアーゼ、ダイワカセイ(大阪、日本)製)300mgを加えた。pH 6  
.7、75でのインキュベーションの間、カゼイン様(caseinaceous)タンパク質の迅速  
な凝結及び沈殿が生じた。3時間一定のpH条件での更なるインキュベーションにより、  
ほとんど沈殿のない浄化した溶液になった。溶液のpHは、pH 5.0に調節され、サー  
モアーゼは、45分間95でインキュベートした。冷却後、溶液をテイスティングし、  
非常に苦いことがわかった。  
pHを6.0にpH調節した後、A.ニガーからのプロリン特異性エンドプロテアーゼ3単  
位(Z-Gly-Pro-pNAでpH 5、37で測定)を25ml加水分解物に加えた。20時間5  
0でインキュベーションした後、他の酵素インキュベーションサイクルを、溶液を30  
分間90に加熱することによって行った。室温に冷却し及びpH値を4.0に調節した

後、カゼイン塩加水分解物は、完全に溶解され、透明であることがわかった。即ち、水に対し、480nm、1cmセルで分光光学的に測定して0.24の光吸収を示した。テイスティングは、苦み及び異臭(off-flavor)がないことを示した。

この2つの濃縮したカゼイン溶液を、同量の、カゼインタンパク質が混入しない新鮮で2倍濃縮された甘い乳清と混合し、pH4.0に酸性化し、その後低速遠心分離をすることによって、最終的に、透明で苦みのないミルク様ドリンクを得た。

【0019】

(実施例3)

甘い乳清の加水分解によって得られる加水分解した乳清タンパク質の透明で苦味のない溶液

甘い乳清は、カゼイン様タンパク質がなく、pH4に溶液を酸性化することによって作成された。遠心分離後、透明な上澄みをデカンテーションした。乳清画分のpHをpH6.8に調節した。この溶液200mlに対し、サーモアーゼ(14000PU/mgの活性を有するバチラスサーモプロテオリチカスロッコ(*Bacillus thermoproteolyticus* Rokko)からの熱安定性メタロエンドプロテアーゼ、ダイワカセイ(大阪、日本)製)200mgを加えた。pH6.7、7.5でのインキュベーションの間、タンパク質のわずかな凝結及び沈殿が生じた。3時間一定のpH条件での更なるインキュベーションにより、いくらか沈殿物を含む浄化した溶液になった。溶液のpHは、pH5.0に調節され、サーモアーゼは、45分間9.5でインキュベートした。冷却後、溶液をテイスティングし、わずかに苦いことがわかった。

pHを6.0にさらにpH調節した後、A.ニガーからのプロリン特異性エンドプロテアーゼ3単位(Z-Gly-Pro-pNAでpH5.37で測定)を25ml加水分解物に加えた。20時間5.0でインキュベーションした後、他の酵素インキュベーションサイクルを、溶液を30分間9.0に加熱することによって行った。室温に冷却し及びpH値を4.0に調節した後、乳清タンパク質加水分解物は、完全に溶解され、透明であることがわかった。即ち、水に対し、480nm、1cmセルで分光光学的に測定して0.35の光吸収を示した。テイスティングは、苦みや異臭(off-flavor)がないことを示した。

【0020】

(実施例4)

エキソプロテアーゼを使用せず、スキムミルクの加水分解によって得られる透明で苦味のないミルクタンパク質ベース溶液

市販のスキムミルク200mlに対し、サーモアーゼ(14000PU/mgの活性を有するバチラスサーモプロテオリチカスロッコ(*Bacillus thermoproteolyticus* Rokko)からの熱安定性メタロエンドプロテアーゼ、ダイワカセイ(大阪、日本)製)300mgを加えた。pH6.7、7.5でのインキュベーションの間、タンパク質の迅速な凝結及び沈殿が生じた。3時間、pHスタート条件での更なるインキュベーションにより、ほとんど沈殿のない浄化した溶液になった。溶液のpHは、pH5.0に調節され、サーモアーゼは、45分間9.5でインキュベートした。冷却後、溶液をテイスティングし、非常に苦いことがわかった。

pHを6.0にさらにpH調節した後、A.ニガーからのプロリン特異性エンドプロテアーゼ3単位(Z-Gly-Pro-pNAでpH5.37で測定)を25ml加水分解物に加えた。20時間5.0でインキュベーションした後、他の酵素インキュベーションサイクルを、溶液を30分間9.0に加熱することによって行った。室温に冷却し及びpH値を4.0に調節した後、カゼイン塩加水分解物は、完全に溶解され、透明であることがわかった。即ち、水に対し、480nm、1cmセルで分光光学的に測定して0.900より小さい光吸収を示した。テイスティングは、苦み及び異臭(off-flavor)がないことを示した。

【0021】

(実施例5)

加水分解されたカゼインナトリウムと種々の加水分解されていない乳清製剤とを混合することによって得られるミルク様組成物を有する透明で酸安定で苦味のない液体

10

20

30

40

50

カゼインナトリウムの6% (質量) 溶液 (90% タンパク質、DMV International, オランダから入手) のpHを8.0に調節し、その後、デルボラーゼ (Delcolase (登録商標)、560000DU / グラム、DSM Food Specialities, Seclin, フランスから入手) 40マイクロリットルをカゼインのグラム当たりで加えた。この混合物を60 で、定常的に攪拌して、150又は210分、pHをコントロールしないか、又は8.0で一定に維持してインキュベートした。インキュベーションの後、加水分解反応を、乳酸を使用してpHを5.0に低め、その後、10分間90 のヒートショックで停止した。その後、温度を50 に低下し、A.ニガーからのプロリン特異性エンドプロテアーゼ (W0 02/45523参照) を加えた。カゼインのグラム当たり、8単位 / ミリリットル含む酵素溶液250マイクロリットル (即ち、実施例1に記載の方法で測定して、2単位 / グラムカゼイン塩) を加え、240、480又は960分間インキュベートした。最後に、10分間95 の追加のヒートショックを適用し、その後、すべての試料を蒸留水に希釈して、3%のカゼイン塩濃度を達成し、14 に冷却し、その後、乳製品中の苦い腐った味を定量する訓練をした専門のテイastingパネルに提供された。テイastingの後、パネルのすべてのメンバーは、種々のデルボラーゼインキュベーション及び続くプロリン特異性エンドプロテアーゼでの480分又は960分のインキュベーションから得られたすべての試料は、苦みがないことで一致した。デルボラーゼだけのインキュベーションの後に得られた試料は、非常に苦く、デルボラーゼ及び240分間のプロリン特異性エンドプロテアーゼでのインキュベーションで得られた試料は、わずかに苦いと評価された。

10

20

30

40

50

#### 【0022】

デルボラーゼでのインキュベーションの後に測定された、Nielsen, P. M.ら (Journal of Food Science, Vol. 66, No. 5, PP 642-646, 2001) に記載されたOPA法を使用する加水分解の程度は、約12%であり、プロリン特異性エンドプロテアーゼでのインキュベーションの後で、DH値は、16~20%の値に増加した。

本質的にウシのミルクと同じ組成を有する製品を調製するために、上記手順を使用して生産された、種々の2倍濃縮 (即ち6グラム / リットル) の苦くないカゼイン加水分解物を、同容量の2倍濃縮 (即ち、1.3グラム / リットル) の加水分解されていない乳清タンパク質と混合した。最初は、異なる乳清タンパク質溶液を市販及び非市販の製品を使用して調製した。種々の試験される乳清製品のなかで、BiPRO (Davisco Foods International)、PROXIME 660又はHIPROTAL 875又はDOMOVICTUS 535 (BDI, オランダ) は、すべて比較的透明で薄い味の製品を生産した。新鮮なチーズ乳清は、強い乳の香り (dairy aroma) を有する黄色みがかって濁った製品を生産した。これら異なる乳清製品及び異なるカゼイン加水分解物から作られるコンビネーションのなかで、特に、低温殺菌していない (市販されていない) パージョンのPROXIME 660とのコンビネーションは、その魅力ある味と、濁度又は異臭 (off-odour) がないことから、特に興味があることがわかった。

#### 【0023】

このようにして調製されるミルク様混合物が非常に透明であるとの事実にもかかわらず、10分間2000gの低速遠心分離又は数時間の単なる沈降とその後のデカンテーションにより、完全に透明な製品になる。遠心分離された製品は、典型的に、水に対して480nm、1cmセルで分光光学的に測定して0.90より低い光吸収となる。最も重要なことに、後者の処理工程で、典型的に溶解した画分が10%未満のタンパク質減少となる。従って、調製された透明溶液は、たとえpHを4.0及び2.8の低い値に酸性化しても、まだ透明であった。

#### 【0024】

(実施例6)

スキムミルクを透明で薄い味の酸安定性最終製品に転換する単純化された加水分解手順39g / リットルのタンパク質、51g / リットルの炭水化物、0.5g / リットルの脂肪の濃度で、最終pH6.5の、市場で入手できるスキムミルク (Friesche Vlag, オランダ) をウォーターバス中で60 で平衡化し、その後、デルボラーゼ (実施例5参照) 40マイクロリットルをカゼインのグラム当たりで加えた (使用したスキムミルクは、30g

カゼイン/リットルを含む)。この混合物を、pH調節せずに定常的に攪拌してインキュベートした。150分後、乳酸を使用してpHを5.0に低め、溶液を2つの部分に分けた。一つの部分は、10分間90℃に加熱してサブチリシンを不活性化したのに対し、他方の部分は、60℃で更に10分間維持した。双方の部分を50℃のウォーターバスに移動し、平衡後、プロリン特異性エンドプロテアーゼを2つのバイアルに加えて、存在するカゼインのグラム当たり250マイクロリットルの酵素の濃度(即ち、2単位;実施例5参照)に達した。960分50℃の追加のインキュベーション期間の後、双方の部分を10分間95℃のヒートショックにかけた。その後、DH値を実施例5に概説した手順を使用して測定した。デルボラーゼインキュベーションの後、DHは、20%だった。プロリン特異性エンドプロテアーゼでのインキュベーションの後、デルボラーゼを不活性化するためのヒートショックを受けた試料は、26%のDH値を有するが、他の試料は、30%のDHを示した。さらに、2つの最終溶液のテイスティングを、14℃で、実施例5で言及したものと同一訓練したパネルによって行った。テイスティングパネルの結果、双方の溶液が同様に苦味がなかった。

10

#### 【0025】

さらに、2つの調製品の低速遠心分離により、pH4にさらに酸性化しても透明性を残す透明溶液が産生した。ペプチドサイズ分析をSuperdex Peptide HR 1030カラムでのクロマトグラフィによって行った。得られたデータは、デルボラーゼ不活性化で調製された物質において、1500ダルトンより小さいペプチドを含む画分が、溶液中に存在するタンパク質の94質量%を示すのに対し、5000ダルトンより小さいペプチドを含む画分が、溶液中に存在するタンパク質の99質量%を示し、この1500ダルトンより小さいペプチドを含む画分は87質量%であり、5000ダルトンより小さいペプチドを含む画分は99質量%であることを示す。

20

結果、本実施例で示される結果は、スキムミルク並びにカゼインが、単純な加水分解手順を使用して、苦みがなく透明な加水分解物に効果的に加水分解され得ることを示す。存在する小さなペプチドのほとんど大部分は、通常のスキムミルクと比較して、得られたスキムミルク加水分解物の極めて減少したアレルギー性を示す。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
30 January 2003 (30.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/007730 A1

- (51) International Patent Classification: A23J 3/34, A23L 2/66, 1/305
- (21) International Application Number: PCT/EP02/08072
- (22) International Filing Date: 18 July 2002 (18.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01202749.6 18 July 2001 (18.07.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): DSM N.V. [NL/NL]; Hec Overloon 1, NL-6411 TE THEERLEN (NL).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): EDENS, Luppó [NL/NL]; Hoflaan 118, NL-3062 JL ROTTERDAM (NL); ROOS, DE, Andre, Leonardus [NL/NL]; Hof van Azuur 33, NL-2614 TB DELFT (NL).
- (74) Agents: MATULEWICZ, Emil, Rudolf, Antonius et al.; DSM N.V., DSM Patents & Trademarks, Office Delft (600-0240), P.O. Box 1, NL-2600 MA DELFT (NL).
- (81) Designated States (national): AU, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report  
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/007730 A1

(54) Title: PROCESS FOR THE HYDROLYSIS OF MILK PROTEINS

(57) Abstract: The present invention provides a composition comprising hydrolysed milk casein and, preferably non-hydrolysed whey protein in a ratio from 9:1 to 1:1 (on dry weight), which is a clear liquid at pH 4 when dissolved or present in water in an amount of 40 g/litre at 10°C.

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

**PROCESS FOR THE HYDROLYSIS OF MILK PROTEINS****Field of the invention**

The present invention relates to compositions comprising hydrolysed milk casein and preferably non-hydrolysed whey protein and in particular to novel processes for the production of hydrolysates comprising hydrolysed casein and preferably non-hydrolysed whey protein. As a result, such hydrolysates can be used in the manufacture of beverages such as sports drinks and soft drinks, dietetic products, infant nutrition or various food products or fermented products.

**Background of the invention**

The protein fraction of bovine milk is associated with health. The health promoting properties reside not only in the nutritional aspects of this protein fraction but also in the various health promoting factors present. Milk proteins consists of approximately 80% caseins. The remaining protein is accounted for by a variety of whey proteins. The casein fraction is the main source of amino acids, calcium and phosphate all of which are required for growth of the young animal. The whey protein fraction is also a source of amino acids and in addition it contains several bioactive and putative health promoting proteins such as immunoglobulins, folate binding protein, lactoferrin, lactoperoxidase and lysozyme. It is also known that upon metabolisation of the casein and whey protein fractions a number of new bioactive peptides are formed. Examples of such newly formed bioactive peptides include casomorphins, casokinins, immunoglobulins, immunopeptides, caseinophosphopeptides, lactiphins and lactoferricin. Therefore, the use of casein and whey proteins in the combination in which they occur in milk offers significant nutritional and health benefits. More recently industrially prepared hydrolysates of milk proteins were also found to contain newly formed bioactive peptides and notably ACE-inhibitors to fight hypertension.

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-2-

The white appearance of milk is caused by the scattering of light by fat globules and casein micelles. Skimmed milk, i.e. milk from which all fat has been removed, is still white because of these casein micelles.

- 5 The whey protein fraction of the milk, i.e. milk after removal of both the fat and casein fraction, is a yellowish but clear protein solution which is rich in various proteins, peptides, lactose, minerals and vitamins. All of these constituents are completely soluble even under acidic conditions. Nevertheless the dissolution of whey proteins may yield turbid solutions as the result of partial denaturation during spray drying.
- 10 Partial enzymatic hydrolysis can improve the dissolution characteristics of these somewhat denatured spray dried whey proteins. More exhaustive enzymatic hydrolysis of whey proteins further improves their solubility but also leads to modest increases in bitterness and levels of free amino acids present. The usual aim of more exhaustive enzymatic hydrolysis of whey proteins is to achieve a reduction in
- 15 allergenicity and an improved intestinal uptake. Especially the reduced allergenicity aspect is commercially important. For example in different countries of Northern Europe cow's milk intolerance has been diagnosed in almost 3% of general populations of infants in the first two years of life. Beta-lactoglobulin belongs, together with the caseins to the major allergens in bovine milk. Adults rarely exhibit bovine
- 20 milk allergies and specialised products for this group must be tailored to be easily assimilable, provide a good taste and exhibit good shelf stabilities, especially under acid conditions. It is therefore not surprising that there exists considerable literature regarding the exhaustive enzymatic digestion of whey hydrolysates aimed at clinical, dietetic and sports applications as well as infant nutrition.

25

In contrast with whey, casein is rich in hydrophobic amino acids so that its hydrolysates are notoriously bitter and tend to have rancid and brothy off-tastes. Due to their extreme bitterness enzymatically hydrolysed caseins find limited application only. Moreover their high content of hydrophobic amino acids make casein derived

30 peptides difficult to dissolve, especially under acid conditions.

Processes for the preparation of partial casein hydrolysates described in the literature generally involve multi-step hydrolyses with a few endoproteases followed by incubation with one or more exoproteases. Combinations of various endoproteases are commonly used to obtain the high Degree of Hydrolysis (high DH)

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-3-

required to minimise possible allergenic reactions and to improve the solubility. Subsequent incubation with exoproteases releases amino-or carboxyterminal amino acid residues to minimise bitter off-tastes. However, the release of free amino acids implies losses in yield and a diminished nutritional value. Because high levels of free amino acids may also result in brothy off-tastes and increased osmotic values of the final hydrolysate, additional processing steps to remove free amino acids, and strongly hydrophobic peptides which account for the bitter off-tastes, are common practice.

Patent application EP 0 610 411 describes completely soluble casein hydrolysates of good organoleptic quality with low molecular weight peptides and a DH value in the order of magnitude of 15 to 35%.

Patent application WO 96/131744 describes a method for production of a milk protein hydrolysate characterised by a hydrolysis reaction involving any neutral or alkaline protease from Bacillus in combination with an Aspergillus enzyme complex comprising both endo-and exopeptidases and a degree of hydrolysis between 35% and 55%.

Patent application EP 384 303 describes a method for production of a protein hydrolysate exhibiting low bitterness and a low DH value using an aminopeptidase.

Patent application EP 223 560 describes a method for production of milk proteins by means of a sequential enzyme hydrolysis.

Patent application EP 0 631 731 describes a partial hydrolysate of a protein mixture comprising whey protein and casein wherein the hydrolysate has a degree of hydrolysis between 4 and 10% and a low bitter hydrolysate is obtained using a combination of trypsin and chymotrypsin.

Patent US 4,600,588 describes a milk protein hydrolysate consisting of acid precipitated casein that has been treated with a.o. an acid fungal protease.

Patent application JP11243866 describes a casein hydrolysate useful for drinks and food which is tasteless and odorless and has a degree of hydrolysis of 17 to 30%.

#### Summary of the invention

The present invention provides a protein composition comprising hydrolysed casein protein and whey protein in a ratio of 9:1 to 1:1 dry weight. Preferably the whey protein is non-hydrolysed. The protein composition is a clear liquid at pH 4 when the

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-4-

hydrolysed casein protein and whey protein are dissolved or present in water in an amount of 40 g of protein (dry weight)/litre at 10°C.

In case the protein composition comprises less than 40 g of protein (dry weight)/litre, this composition is still a clear liquid at 10 degrees C when concentrated to a liquid of  
5 40 g of protein (dry weight)/litre.

The present invention also provides a method of production of a composition comprising casein protein and whey protein, wherein at least the casein fraction is hydrolysed.

10

The present invention also provides a product comprising a composition of the invention, for example a beverage such as a sports drink or a soft drink or a health drink or a dietetic food such as a product for elderly or for slimming people or an infant formula such as a term or follow-on product. Moreover it can be a fermented  
15 product or it can be incorporated into various personal care products.

#### **Detailed description of the invention**

20

The product according to the invention preferably comprises whey protein and casein in a ratio as present in bovine milk. To take advantage of the bioactive peptides and proteins present, preferably enzymatic hydrolysis of the whey protein should be minimal. Enzymatic hydrolysis of the caseins should be far enough to guarantee a high protein yield in a clear product under acid conditions. Therefore the  
25 casein protein is hydrolysed by a sufficient amount of enzymes for a sufficient period of time to become an almost completely hydrolysed protein. Almost completely hydrolysed implies that only a few percent of the caseinate is not completely soluble and can cause some turbidity in the final hydrolysate. Similarly the whey fraction can contain some residual insoluble material such as traces of caseins. To remove this  
30 insoluble matter from the mixture of casein hydrolysate and whey, either low speed centrifugation (for example at 2000-5000 g) or simple sedimentation followed by decantation provides industrially acceptable processing steps to obtain a clear product. It should be understood that regular cow milk cannot be clarified using either the low speed centrifugation or the sedimentation/decantation step. After mixing

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-5-

the hydrolysed casein proteins with whey proteins and preferably a low speed centrifugation, the resulting product yields a clear liquid at pH4 when dissolved or present in water in an amount of 40 g of protein (dry weight) per litre. In general hydrolysis takes place at pH from 3,5 to 9 and a temperature from 40 to 80°C.

- 5 Preferably the protein hydrolysate has a whey to casein ratio as present in bovine milk, and is clear under acidic conditions. Preferably the hydrolysate has an improved neutral or bland taste and a good shelf stability.

- A liquid composition is "clear" if at 10°C and pH4 its optical absorption measured at 480 nanometer and using a 1cm glass cell is below 1.00, preferably  
10 below 0.50, if measured against a supernatant of the same composition at 10°C and pH4 that has been obtained after a centrifugation at 20,000 g for 20 minutes.

- The present invention provides a mixture of milk protein hydrolysates, preferably casein hydrolysate and whey, in casein to whey ratios of 9:1 to 1:1 dry weight, preferably in a ratio as present in bovine milk. Moreover the present invention  
15 provides a method of production of such mixtures and nutritional beverages derived thereof. The protein hydrolysate can also be used in infant formulae, dietetic foods, nutraceuticals, ice creams, dressings, fermented products, yoghurts, and personal care products. In general the composition according to the invention has a strongly reduced allergenicity compared with bovine milk. In general the composition  
20 according to the invention has a bland or neutral taste and an improved solubility and transparency under acid conditions and can be used as basis for other beverages such as sport drinks or soft drinks or health drinks or fermented products. By the term bland taste is meant a bitterness level which is similar to or lower than a level of 15 mg/litre of kinine sulphate dissolved in distilled water and tasted at a temperature of  
25 14°C.

- To further improve the health benefits of the product of the present invention, the protein composition can be combined with vitamin concentrates, fruit or fruit  
30 fractions to lift the vitamin and fiber contents of the final product and even hydrolysate fractions to lift the level of bioactive peptides. Moreover the product of the invention can be fermented with a variety of microbial cultures to improve the taste, to improve the health benefits or to increase the viscosity of the final product. Ideally the fermentation is carried out simultaneously with the incubation of the proline specific endoprotease at a temperature between 40 and 50 degrees C. If the starter culture

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-6-

used generates a high viscosity, then the fermentation is best carried out after the low speed centrifugation step. Following inoculation with a suitable starter culture or a combination of various starter cultures, the whole mixture is fermented till the required acid pH is reached and then cooled down to 10-20 degrees C. The fermented base thus produced can be homogenized or diluted with water or juice, cooled to 4 degrees C and filled into the required retail containers, i.e. with or without a pasteurisation or sterilisation step. To gain a broad consumer acceptance among consumers with non-medical needs, a high palatability as well as certain physico-chemical aspects such as solubility under acid conditions are of overriding importance. A clear and non-white appearance is an important plus as well as the absence of odours and aroma's such as diacetyl which are usually associated with dairy products. Therefore the present invention provides a method to produce a clear liquid under acidic conditions with low allergenicity compared to bovine milk and having the health promoting properties and nutritional effect of milk, which can be used in food applications such as beverages, including carbonated beverages, fermented products and food products.

The method of production of hydrolysates according to the invention may be carried out by using skimmed milk, skimmed milk powders, milk protein concentrates, mixtures of whey protein and casein in preferred ratios or isolated whey protein fractions and isolated casein fractions which are then mixed to obtain the preferred ratios, as starting materials or may be mixed after (part of) the fractions are hydrolysed or may be mixed during hydrolysis. The whey proteins may be sourced from liquid whey obtained from cheese making, preferably a sweet whey such as that resulting from the coagulation of casein by an animal or microbial rennet which is further purified from contaminating caseins, for example by acidification followed by centrifugation. Preferably concentrated, non-spray dried versions of these whey products are used. Optionally commercially available whey protein powders may be used such as BIPRO (Davisco Foods International), PROXIME 660 or HIPROTAL 875 or DOMOVICTUS 535 (BDI, The Netherlands) or more preferably their non-spray dried equivalents. Optionally the whey used may have been subjected to non-proteolytic enzymes such as lactase to convert the lactose present into glucose and galactose. Optionally the whey material may have been demineralised.

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-7-

The present invention preferably envisages none or only very limited hydrolysis of the whey protein fraction. Additionally, the present invention envisages a hydrolysate in which both the whey fraction and the casein fraction are hydrolysed as will occur during the hydrolysis of for example skim milk or skim milk powders. Skim milk is milk which is defatted and thus contains preferably less 1 g/litre of fat, preferably less than 0.8 g/litre of fat. In the product according to the invention using skim milk or skim milk powder as the starting material, the peptide fraction with a molecular weight below 1500 Daltons typically represents more than 85wt% of the protein present in the composition of the invention whereas the peptide fraction below 5000 Daltons typically represents more than 95wt% of the protein present in the composition of the invention. Therefore, the products according to the invention will preferably exhibit a markedly reduced allergenicity compared to the starting protein. The invention also envisages hydrolysates with lowered osmotic values such as can be obtained after nanofiltration, ion exchange or electro dialysis.

Transparency and acid solubility of the casein fraction can be obtained by enzymatically hydrolysing casein micelles to smaller peptides.

The casein source can either be rennet casein, acid casein or sodium, calcium or potassium caseinate. For the process of this invention, the proteins are diluted or reconstituted in a solution containing from 10 to 150 gram protein per litre (1-15% w/w), preferably from 20 to 60 gram protein per litre.

To obtain partial hydrolysates, the proteins are first subjected to an endoprotease with a pH optimum between 4 and 10 and a preference for cleaving proteins at the carboxyterminal side of bulky, hydrophobic amino acid residues. Preferably the endoprotease is free of exoprotease.

Preferred endoproteases with such characteristics are subtilisin (EC3.4.24.4 or Pescalase as supplied by DSM Food Specialities, Seclin, France or Alcalase as supplied by NOVO, Bagsvaerd, Denmark), thermolysin (EC3.4.24.4 or Thermoase as supplied by Daiwa Kasei, Osaka, Japan), neutral metallo protease (EC3.4.24.28 or Brewers Protease 2000 as supplied by DSM Food Specialities, Seclin, France or Neutrase as supplied by NOVO) or chymotrypsin (EC3.4.21.1). Another preferred endoprotease is a proline-specific endoprotease. A proline specific endoprotease can imply preferential cleavage at either the aminoterminal or the carboxyterminal side of

proline. Endoproteases capable of cleaving at the aminoterminal side of proline are known (Nature, Vol 391, 15 January 15, pp301-304,1998). Endoproteases with a preference for cleaving at the carboxyterminal side of proline are also known (EC3.4.21.26). The latter type of proline-specific endoprotease is preferably obtained from food-grade overproducing recombinant strains such as *Aspergillus*. An example of a suitable producer of this enzyme has been described in co-pending patent EP-application number PCT/EP01/14480. As this proline-specific endoprotease can only hydrolyse peptide bonds involving proline residues, this enzyme can advantageously be combined with one of the preferred endoproteases to hydrolyse the combined whey protein and casein or the isolated fractions. An important advantage of using a proline specific endoprotease is that it is capable of cleaving major allergenic epitopes in both caseins and whey proteins. For example, casein is very rich in proline residues and thus can be frequently cut by the proline specific endoprotease. The three major allergenic epitopes of beta-lactoglobuline (fragments 41-60, 102-124 and 149-162; Clinical and Experimental Allergy, 1999, Vol 29, pp1055-1063) all contain a central proline residue so that incubation with the endoprotease is likely to reduce recognition by the relevant human IgE's hereby minimising the allergenicity of the final product. A preferred embodiment of the process according to the invention is that the casein fraction or both the whey fraction and the casein fraction are subjected to hydrolysis involving at least a proline-specific endoprotease.

Another preferred embodiment of the process according to the invention is that the enzymatic hydrolysis of the whey fraction, the casein fraction or the protein fraction, as present in whole milk, is hydrolysed with the use of endoproteases only i.e. without the use of any exoproteases.

Depending on the pH optimum of the proline-specific endoprotease, the hydrolysis can be carried out in combination with or separate from the other endoprotease. The hydrolysis can be carried out under constant pH or uncontrolled pH conditions. Preferably the hydrolysis is carried out in two steps, firstly the proteins are incubated under neutral or alkaline conditions with an endoprotease with a preference for cleaving proteins at the carboxyterminal side of bulky, hydrophobic amino acid residues. During this hydrolysis the pH drops to acidic values (i.e. below pH 7) and only then the second endoprotease is added, preferably a proline-specific endoprotease, more preferably a proline specific endoprotease obtained from *Aspergillus*.

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-9-

The quantity of enzyme required to achieve the desired degree of hydrolysis depends upon the enzyme used. However, the enzyme dosage and incubation conditions are optimised in such a way so that the majority of the casein protein fraction is dissolved in the aqueous phase of the reaction after incubation periods of typically 6 to 20 hours. By majority is meant that under pH 4, less than 20%, preferably less than 10%, more preferably less than 5% of the protein present in the casein fraction can be precipitated upon centrifugation for 10 minutes at 2000 g.

An additional debittering of the hydrolysate resulting from the incubation with the endoproteases may be beneficial. Additional debittering is preferably carried out by simultaneous or subsequent incubation with an exoprotease preparation which is preferably free from endoproteolytic activity. Where the incubation is carried out subsequent to the incubation with the endoprotease, pH adjustment with hydrochloric acid may be necessary; inactivation of the endoprotease is usually not required. Debittering can also be carried out under neutral or slightly acidic conditions with a suitable aminopeptidase which exhibits a preference for removing amino terminal hydrophobic amino acid residues such as for example Accellerzyme (DSM Food Specialities; Delft, The Netherlands) or Corrolase LAP (Röhm, Darmstadt, Germany) or APII from *Bacillus stearothermophilus* and isolated as described by Stoll et al (BBA 438(1976) 212-220). Alternatively debittering can be carried out under slightly acidic conditions with a suitable carboxypeptidase which exhibits a preference for removing carboxyterminal hydrophobic amino acid residues such as CPDI (PepG) from *Aspergillus* (Dai Degan *et al.* Appl. Environ Microbial, 58(7)2144-2152). Optionally a combination of the two types of exoproteases can be used under slightly acidic conditions. Preferred incubation temperatures for the endoproteases as well as the exoproteases are 40°C or higher, preferably 50°C to 80°C.

Irrespective of the conditions of the hydrolysis, the final hydrolysate preferably is subjected to an additional step of enzyme inactivation. The enzyme inactivation step can be an heat treatment which comprises heating to a temperature of at least 85°C for at least 10 minutes. If higher temperatures or more extreme pH values are used, shorter periods may be feasible. Such heat treatment is preferably carried out at an acidic pH value, preferably between 3 and 7. To remove any non solubilised material from the final product, decantation or low speed centrifugation at for example 2000-4000 g as can be carried out at industrial scale is preferred. Optionally the

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-10-

hydrolysate can be filtered using an ultrafilter, a microfilter, diatomaceous earth, fiberglass filters or using cross-flow filtration. Complete enzyme inactivation can be confirmed by a dye-gelatin test. Optionally the filtered final hydrolysate can be treated with activated charcoal or with nanofiltration, ion exchange or electro dialysis to remove a surplus of salts. The filtered hydrolysate can be pasteurised or sterilised and, if required, further concentrated by drying techniques such as evaporation, nano filtration, spray drying, fluidized bed drying or combinations thereof. Preferably the obtained product is in granular form.

Advantageously the ratio of casein and whey protein is substantially present as bovine milk. The whey protein is preferably non-hydrolysed protein.

Advantageously casein or whey protein or a combination of the two are hydrolysed using endoproteases only i.e. without the use of an exoprotease.

Preferably the final protein mixture comprises from 10 to 50% whey protein and from 90 to 50% casein. More preferably the protein mixture comprises from 20 to 40% whey protein and from 80 to 60% casein. Percentages of casein and whey protein are both expressed on a dry weight basis.

In a preferred embodiment of the invention caseinate is hydrolysed with a preferred endoprotease and then subjected to incubation with a proline specific endoprotease. As such or preferably after centrifugation, the casein hydrolysate is concentrated and dried. The dried product can be redissolved in non-hydrolysed whey to obtain the desired protein concentration and protein ratio and then, if required, centrifuged or filtered and pasteurised or sterilised to obtain the product according to the invention. Alternatively the concentrated casein hydrolysate is mixed with concentrated, non-hydrolysed whey protein to reach the desired protein concentration and protein ratio and then optionally centrifuged or filtered and optionally pasteurised or sterilised to obtain the product according to the invention.

Obviously the product can be subjected to additional enzyme treatments such as lactases or fermented with different types of starter cultures or combined with all kinds of ingredients such as fruit concentrates, flavours, colorants, alcohol, carbon dioxide, thickeners, acidulants, antioxidants, herbs or herb extracts, health promoting compounds like vitamins or provitamins or bioactive peptides or carbohydrates or amino acids to formulate a product which is in line with the marketing needs.

In the final application in which the pH value is in general higher than 3, preferably higher than 3.5 and the total protein concentration is less than 5 % w/w,

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-11-

preferably less than 3.5 % w/w, the optical absorption of the solution (comprising 40g/l protein) as measured at a wavelength of 480 nm is less than 1.000, preferably less than 0.50 as measured against the supernatant of the solution, that has been obtained after a centrifugation at 20,000g for 20 minutes, using a 1 cm glass cell at 10°C and pH4.

#### Example 1

##### Hydrolysis of Casein using proline specific endoprotease

10 The incubation of 1 gram of thermolysin per kg of a sodium caseinate powder, in a solution/suspension containing 60 grams of sodium caseinate (Miprodan 30 as supplied by MD Foods, Viby, Denmark ) per litre at pH 6.7 and 75°C under constant pH conditions after 3 hours resulted in a clarified solution, with almost no precipitate. After adjustment of the pH to 5.0, the enzyme was inactivated at 95°C for 45 minutes.

15 The liquid was cooled and tasted giving a very bitter taste. The pH was adjusted to 6.0 and 3 units of proline specific endoprotease from *A. niger* were added to 25 ml of this caseinate hydrolysate. One activity unit of proline specific endoprotease from *A.niger* is defined as the amount of enzyme required to liberate 1 µ mol of pNA per minute from N-carbobenzoxy -glycine-proline-p NitroAnilide (z-Gly-Pro-pNA)(Bachem, Switzerland) at pH 5 and 37°C. The liberation of pNA is measured by

20 optical absorption at 410 nm. After incubation at 50°C overnight, the pH was again adjusted to 5.0 and another enzyme inactivation step (30 minutes at 90°C) was carried out. After cooling to room temperature, the caseinate hydrolysate was completely dissolved and clear.

25 Tasting demonstrated the absence of any bitterness.

HPLC using an ion trap mass spectrometer (Thermoquest, Breda, the Netherlands) coupled to a P4000 pump (Thermoquest, Breda, the Netherlands) was used in characterising the molecular weight distribution of the casein peptides as produced by the enzyme incubation. The peptides formed were separated using a

30 PEPMAP C18 300A (MIC-15-03-C18-PM, LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) column in combination with a gradient of 0.1% formic acid in Milli Q water (Millipore, Bedford, MA, USA; Solution A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (Solution B) for elution. The gradient started at 100% of Solution A and increased to 70% of solution B in 45 minutes and was kept at the latter ratio for another 5

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-12-

minutes. The injection volume of 50 µl was used, the flow rate was 50 µl per minute and the column temperature was maintained at 30°C. The protein concentration of the injected sample was approx. 50 µg/ml. According to the data obtained, most of the casein peptides had molecular weights ranging from 300 to 1200 D.

5

#### **Example 2**

A clear, non bitter milk-like drink obtained by mixing extensively hydrolysed caseinate with non-hydrolysed sweet whey.

10

To 200 mL of a solution of sodium caseinate (Miprodan 30 supplied by MD Foods, Viby, Denmark), containing 60 grams per liter, 300 mg of Thermoase (a heat stable metallo-endoprotease from *Bacillus thermoproteolyticus Rokko* with an activity of 14 000 PU/mg as produced by Daiwa Kasei, Osaka, Japan) was added. During incubation at pH 6.7 and 75°C immediate flocculation and precipitation of caseinaceous protein occurred. Further incubation for three hours under constant pH conditions resulted in a clarified solution, with almost no precipitate. The pH of the solution was adjusted to pH 5.0 and the Thermoase inactivated by heating for 45 min at 95°C. After cooling, the solution was tasted and found to be very bitter.

15

After pH adjustment to pH 6.0, 3 units of proline specific endoprotease (as measured using Z-Gly-Pro-pNA at pH 5 and 37°C) from *A. niger* was added to 25 ml of the hydrolysate. After incubation for 20 hours at 50°C, another enzyme inactivation cycle was carried out by heating the solution for 30 minutes at 90°C. After cooling to room temperature and adjustment of the pH value to 4.0, the caseinate hydrolysate was found to be completely dissolved and clear i.e. showing an optical absorption of 0.24 as determined spectrophotometrically at 480 nm in a 1 cm cell against water. Tasting demonstrated the absence of any bitterness or off-flavors.

20

Mixing of this twice concentrated casein solution with the same quantity of fresh, double concentrated sweet whey that had been freed from contaminating casein protein by acidification to pH 4.0 followed by low speed centrifugation, finally yielded a clear, non-bitter milk-like drink.

25

30

**Example 3**

5 A clear, non-bitter solution of hydrolysed whey proteins obtained by hydrolysis of sweet whey .

Sweet whey was made free from caseinaceous protein by acidification of the solution to pH 4. After centrifugation the clear supernatant was decanted. The pH of the whey fraction was adjusted to pH 6.8. To 200 ml of this solution 200 mg of Thermoase (a  
10 heat stable metallo-endoprotease from *Bacillus thermoproteolyticus Rokko* with an activity of 14 000 PU/ mg as produced by Daiwa Kasei, Osaka, Japan) was added. During incubation at pH 6.7 and 75 °C slight flocculation and precipitation of protein occurred. Further incubation for three hours under constant pH conditions resulted in a clarified solution, still containing some precipitate. The pH of the solution was  
15 adjusted to pH 5.0 and the Thermoase inactivated by heating for 45 min at 95 °C. After cooling down, the solution was tasted and observed to be slightly bitter. After another pH adjustment to pH 6.0, 3 units of proline specific endo-protease (as measured using Z-Gly-Pro-pNA at pH 5 and 37 degrees C) from *A. niger* was added to 25 ml of the hydrolysate. After incubation for 20 hours at 50°C, another enzyme  
20 inactivation cycle was carried out by heating the solution for 30 minutes at 90°C. After cooling to room temperature and adjustment of the pH value to 4.0, the whey protein hydrolysate was found to be completely dissolved and clear i.e. showing an optical absorption of 0.35 as determined spectrophotometrically at 480 nm in a 1 cm cell against water. Tasting demonstrated the absence of any bitterness or off-flavors.

25

**Example 4**

A clear, non bitter, milk protein based solution obtained by hydrolysis of skim milk without the use of exoproteases.

30

To 200 mL of a commercially available skim milk 300 mg of Thermoase (a heat stable metallo-endoprotease from *Bacillus thermoproteolyticus Rokko* with an activity of 14 000 PU/ mg as produced by Daiwa Kasei, Osaka, Japan) was added. During  
incubation at pH 6.7 and 75°C immediate flocculation and precipitation of protein  
35 occurred. Further incubation for three hours under pH stat conditions resulted in a

clarified solution, almost without precipitate. The pH of the solution was adjusted to pH 5.0 and the Thermoase was inactivated by heating for 45 min at 95°C. After cooling down, the solution was tasted and observed to be very bitter.

5 After another pH adjustment to pH 6.0, 3 units of proline specific endoprotease (as measured using Z-Gly-Pro-pNA at pH 5 and 37 degrees C) from *A. niger* was added to 25 millilitres of the hydrolysate. After incubation for 20 hours at 50°C, another enzyme inactivation cycle was carried out by heating the solution for 30 minutes at 90°C. After cooling to room temperature and adjustment of the pH value to 4.0, the caseinate hydrolysate was found to be completely dissolved and clear i.e. showing an

10 optical absorption of less than 0.900 as determined spectrophotometrically at 480 nm in a 1 cm cell against water. Tasting demonstrated the absence of any bitterness or off-flavors.

#### Example 5

15 A clear, acid stable, non bitter liquid with a milk-like composition obtained by mixing hydrolysed sodium caseinate with various non-hydrolysed whey preparations.

The pH of a 6 % (wt) solution of sodium caseinate (90% protein as obtained from DMV International, The Netherlands) was adjusted to 8.0 after which 40 microliter of Delvolase (Delvolase®, 560 000 DU per gram as obtained from DSM Food Specialities, Seclin, France) ) was added per gram of casein. Then the mixture was incubated at 60 degrees C with constant stirring for either 150 or 210 minutes at a pH which was either non-controlled or held constant at 8.0 . After incubation, the

20 hydrolysis reaction was stopped by lowering the pH to 5.0 using lactic acid followed by a heat shock of 10 minutes at 90 degrees C. Then the temperature was lowered to 50 degrees C and proline specific endoprotease from *A. niger* (see WO 02/45523) was added. Per gram of casein 250 microliter of an enzyme solution containing 8 units per millilitre (i.e.2 units/gram caseinate, measured as described in Example 1)

30 was added and incubated for either 240, 480 or 960 minutes. Finally an additional heat shock of 10 minutes at 95 degrees C was applied after which all samples were diluted with distilled water to reach a caseinate concentration of 3%, cooled down to 14 degrees C and then offered to a specialised tasting panel trained in quantifying bitter off-tastes in dairy products. After tasting, all members of the panel agreed that

35 all samples obtained from the various Delvolase incubations and their subsequent

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-15-

480 or 960 minutes incubation with the proline specific endoprotease were non-bitter. Samples obtained after incubation with just Delvolase were considered to be extremely bitter, samples obtained with Delvolase and a 240 minutes incubation with proline specific endoprotease were rated as slightly bitter.

- 5 The degree of hydrolysis using the OPA method as described by Nielsen, P.M. *et al* (Journal of Food Science, Vol 66, No 5, PP 642-646, 2001) as measured after the incubations with Delvolase were about 12%; after incubation with the proline specific endoprotease the DH values increased to values between 16 and 20%.
- 10 To prepare a product with a composition which is essentially the same as bovine milk, the various double concentrated (i.e. 6 grams/liter) non-bitter caseine hydrolysates as produced using the above mentioned protocols were mixed with an equal volume of double concentrated (i.e. 1.3 grams/liter), non-hydrolysed whey proteins. At first different whey protein solutions were prepared using commercial and
- 15 non-commercial products. Among the various whey products tested, BIPRO (Davisco Foods International), PROXIME 660 or HIPROTAL 875 or DOMOVICTUS 535 (BDI, The Netherlands) all yielded relatively clear and bland tasting products. Fresh cheese whey yielded a yellowish turbid product with a strong dairy aroma. Among the combinations made with these different whey products and the different caseine
- 20 hydrolysates, especially the combination with a non-pasteurised (non-commercial) version of PROXIM 660 proved to be particularly interesting because of its attractive taste and lack of turbidity or off-odours.
- Despite the fact that the milk-like mixtures thus prepared were quite transparent, low
- 25 speed centrifugation of 10 minutes at 2000 g or simple sedimentation for a few hours followed by decantation resulted in completely clear products. The centrifuged products typically resulted in optical absorption below 0.90 as determined spectrophotometrically at 480 nm in a 1 cm cell against water. Most importantly the latter processing steps resulted in protein losses which were typically less than 10%
- 30 of the fraction dissolved. The clear solutions thus prepared also remained clear even upon acidification to pH to values as low as 4.0 and 2.8.

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-16-

**Example 6**

A simplified hydrolysis protocol to convert skim milk into a clear, bland tasting and acid stable end product.

5

Commercially available skim milk (Frische Vlag, The Netherlands) with a concentration of 39 grams /litre of proteins, 51 grams/litre of carbohydrate, 0.5 grams/litre of fat and a final pH of 6.5 was equilibrated in a waterbath at 60 degrees C after which 40 microlitre of Delvolase (see Example 5) was added per gram of casein (the skim milk used contains 30 grams casein/litre). The mixture was incubated with constant stirring without pH adjustments. After 150 minutes of incubation, the pH was lowered to 5.0 using lactic acid and the solution was split into two portions. One portion was heated for 10 minutes to 90 degrees C to inactivate the subtilisin whereas the other portion was kept at 60 degrees C for an additional 10 minutes.

15

Then both portions were transferred to a waterbath of 50 degrees C and after equilibration proline specific endoprotease was added to the two vials to reach concentrations of 250 microlitre of enzyme (i.e. 2 units; see Example 5) per gram of casein present. After an additional incubation period of 960 minutes at 50 degrees C, both portions were subjected to a heat shock of 10 minutes at 95 degrees C.

20

Then the DH values were determined using the protocol as outlined in Example 5. After the Delvolase incubation, the DH was 20 %. After incubation with the proline specific endoprotease the sample subjected to a heat shock to inactivate the Delvolase had a DH value of 26% whereas the other sample showed a DH of 30%. Tasting of the two final solutions was again carried out at 14 degrees C and by the same trained panel as mentioned in Example 5. According to the conclusion of the tasting panel, both solutions were equally non-bitter.

25

Again, low speed centrifugation of the two preparations yielded clear solutions that remained clear upon further acidification to pH 4. Peptide size analysis was carried out by chromatography over a Superdex Peptide HR 1030 column. The data obtained showed that the in the material prepared with Delvolase inactivation, the fraction containing peptides smaller than 1500 Daltons represented 94wt% of the protein present in the solution whereas the fraction containing peptides smaller than 5000 Daltons represented 99wt% of the protein present in the solution. In the material prepared without inactivation of the Delvolase, the fraction containing peptides

30

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-17-

smaller than 1500 Daltons represented 87wt% and the fraction containing peptides smaller than 5000 Daltons also 99wt% of all proteins present.

In conclusion the results shown in the present Example demonstrate that skim milk as well as caseines can be effectively hydrolysed to non-bitter, clear hydrolysates using a simplified hydrolysis protocol. The very large proportion of small peptides present suggests a strongly reduced allergenicity of the resulting skim milk hydrolysate in comparison with regular skim milk.

**CLAIMS**

1. A composition comprising hydrolysed casein protein and whey protein in a ratio of from 9:1 to 1:1 dry weight, which is a clear liquid at pH 4 when dissolved or present in water in an amount of 40 g/litre at 10°C.
2. A composition according to claim 1 wherein the whey protein fraction is non-hydrolysed.
3. A composition according to claims 1 or 2 having a reduced allergenicity compared to the protein composition before hydrolysis.
4. A composition according to any one of claims 1 to 3 whereby the peptide fraction of the hydrolysed protein having a molecular weight below 5000 Dalton is more than 90%wt, preferably more than 95%wt of the protein present in the hydrolysed protein.
5. A composition according to any one of claims 1 to 4 whereby the peptide fraction of the hydrolysed protein having a molecular weight below 1500 Dalton is more than 80%wt, preferably more than 85%wt of the protein present in the hydrolysed protein.
6. A composition according to any one of claims 1 to 5 wherein skim milk is used as protein source.
7. A composition according to any one of claims 1 to 6 which contains from 10 to 150 of total protein dry weight per 1000 g of the composition.
8. A composition according to any one of claims 1 to 6 which contains less than 10% w/w, preferably less than 5% w/w of water.
9. A foodstuff preferably a beverage comprising a composition according to any one of the preceding claims.
10. A beverage according to claim 9 which is a sports drink or a soft drink or a health drink.
11. A method of production of a composition comprising hydrolysed casein protein and whey protein which comprises hydrolysing at least casein protein to result in a composition which is a clear liquid at pH 4 when dissolved or present in water in an amount of 40 g/litre at 10°C wherein the casein and whey protein fraction are present in a ratio of from 9:1 to 1:1 dry weight.

WO 03/007730

PCT/EP02/08072

-19-

12. A method according to claim 11 wherein the whey fraction and casein fraction are hydrolysed.
13. A method according to claim 11 or 12 wherein the casein and/or whey fraction is hydrolysed by an endoprotease preferably a proline specific endoprotease.
- 5 14. A method according to anyone of claims 11 to 13 further comprising hydrolysis by a proline specific endoprotease wherein the proline-specific endoprotease hydrolysis is carried out before, subsequently to or simultaneously with another endoprotease.
- 10 14. A method according to anyone of claims 11 to 14 whereby simultaneously or subsequently to the endoprotease hydrolysis, exoprotease is added.
15. Use of composition according to any one of claims 1 to 8 in food or feed.
16. Use according to claim 14 in food or feed to obtain a reduced allergenicity or increased bioactivity of the protein in the food or feed compared to non-hydrolysed protein.
- 15

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/08072
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A23J3/34 A23L2/66 A23L1/305 International Patent Classification: A23J 3/34, A23L 2/66, 1/305 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A23J A23L Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, FSTA, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 405 756 A (NAITO HIROSHI ET AL) 11 April 1995 (1995-04-11) column 7, line 25 - line 30; claims; example 7	1,6,9-11
A	US 5 486 461 A (NIELSEN PER M) 23 January 1996 (1996-01-23) claims 1,15 & EP 0 610 411 A 17 August 1994 (1994-08-17) cited in the application	1-3,9,11
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 291 (C-1067), 4 June 1993 (1993-06-04) & JP 05 017368 A (HORINAGA MILK IND CO LTD), 26 January 1993 (1993-01-26) abstract	1,3
---		
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 November 2002		Date of mailing of the international search report 28/11/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Grittern, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/08072
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 631 731 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 4 January 1995 (1995-01-04) cited in the application claims 1,9 ---	1-3,9,11
A	EP 0 601 802 A (VALIO LTD) 15 June 1994 (1994-06-15) claims 1,10; example 5 ---	1,3,9, 14,16
A	EP 1 062 873 A (NUTRICIA NV) 27 December 2000 (2000-12-27) claims 18-22; example 2 -----	1-3,9, 11-16

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No  
 PCT/EP 02/08072

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5405756	A	11-04-1995	JP 2007616 B 20-02-1990
			JP 58170440 A 07-10-1983
			CA 1237937 A1 14-06-1988
			EP 0090406 A1 05-10-1983
US 5486461	A	23-01-1996	AT 142430 T 15-09-1996
			AU 657451 B2 09-03-1995
			AU 2942392 A 07-06-1993
			CA 2123091 A1 13-05-1993
			DE 69213755 D1 17-10-1996
			DE 69213755 T2 06-02-1997
			WO 9308702 A1 13-05-1993
			DK 610411 T3 23-12-1996
			EP 0610411 A1 17-08-1994
			FI 942122 A 06-05-1994
			JP 7500733 T 26-01-1995
			JP 3121014 B2 25-12-2000
			KR 259127 B1 15-06-2000
			NO 941701 A 06-05-1994
			NZ 245031 A 26-01-1994
			RU 2086143 C1 10-08-1997
			JP 05017368
EP 0631731	A	04-01-1995	US 5405637 A 11-04-1995
			AT 205056 T 15-09-2001
			AU 672697 B2 10-10-1996
			AU 6598894 A 12-01-1995
			CA 2126639 A1 31-12-1994
			CN 1105818 A ,B 02-08-1995
			DE 69428165 D1 11-10-2001
			DE 69428165 T2 16-05-2002
			EP 0631731 A1 04-01-1995
			ES 2160606 T3 16-11-2001
			JP 7023717 A 27-01-1995
			US 5589357 A 31-12-1996
			EP 0601802
EP 0601802 A1 15-06-1994			
NO 934032 A 13-06-1994			
EP 1062873	A	27-12-2000	EP 1062873 A1 27-12-2000
			AU 3242001 A 18-06-2001
			BR 0016341 A 27-08-2002
			EP 1237419 A1 11-09-2002
			WO 0141581 A1 14-06-2001
			NO 20022751 A 12-08-2002

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 エデン ルッポ

オランダ エヌエル - 3 0 6 2 イェーエル ロッテルダム ホフラーン 1 1 8

(72)発明者 ルース デ アンドレ レオナルデユス

オランダ エヌエル - 2 6 1 4 テー ベー デルフト ホフ ハン アズール 3 3

Fターム(参考) 2B150 DD01

4B017 LC03 LK18 LP06

4B018 MD71 ME07