

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

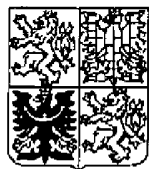
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

250-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSL OVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04. 07. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 26.07.96, 26.07.96

(31) Číslo prioritní přihlášky: 96/96305499, 96/96305497

(33) Země priority: EP, EP

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14. 07. 99**
(Věstník č. 7/99)

(86) PCT číslo: **PCT/EP97/03636**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/04147**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 23 G 9/02

(71) Přihlášovatel:

UNILEVER N. V., Rotterdam, NL;

(72) Původce:

Fenn Richard Anthony, Sharnbrook, GB;

Needham David, Sharnbrook, GB;

Smallwood Keith, Sharnbrook, GB;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha
1, 11696;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob výroby mraženého potravinářského
ho produktu**

(57) Anotace:

Způsob výroby mraženého potravinářského
produktu zahrnujícího nemrznoucí polypepti-
dy /AFP/, ve kterém se podmínky zvolí tak, že
ledové krystaly v produkci mají stranový
poměr, definovaný jako délka dělená šířkou,
od 1,1 do 1,9.

CZ 250-99 A3

Způsob výroby mraženého potravinářského produktu

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu výroby potravinářského produktu obsahujícího AFP a potravinářských produktů obsahujících AFP.

Dosavadní stav techniky

Nemrznoucí peptidy (AFP) byly navrženy pro zlepšení tolerance potravinářských produktů k zmrazování.

Nemrznoucí proteiny již byly popsány v literatuře, viz například Marilyn Griffith a K. Vanya Ewart v Biotechnology Advances, svazek 13, č. 3, strany 375 - 402, 1995. Nemrznoucí vlastnosti obecně naplňují jednu nebo více z následujících vlastností: termální hystereze, inhibice rekrytalizace ledu, řízení tvaru ledových krystalů a interakce s ledovými zárodky.

Termální hystereze je nejlépe známá vlastnost AFP, přičemž tato vlastnost je obvykle využívána pro testování přítomnosti AFP. Termální hystereze má za následek snižování zmrazovací teploty roztoku obsahující AFP s aktivní termální hysterezí, aniž by byla ovlivněna teplota tání. Identifikace zdrojů AFP prostřednictvím testů termální hystereze je široce popsána v literatuře, viz například John G. Duman v Cryobiology 30, 322-328 (1993).

Inhibice rekrytalizace ledu je další vlastností AFP. Tato vlastnost je rovněž nazývána jako potlačení růstu ledových krystalů. Tato vlastnost může být testována prostřednictvím porovnání v určitém časovém okamžiku velikosti ledových krystalů za přítomnosti AF a za

nepřítomnosti AFP. Aplikace tohoto postupu při testování rybích AFP je popsána v US patentu č. 5,118,792 (DNA Plant Technology Corporation).

5 Třetí vlastností AFP je jejich schopnost ovlivnit tvar ledových krystalů. Tato vlastnost pramení ze selektivního vázání AFP k určitým stranám ledového krystalu, čímž je zároveň omezován růst krystalů v určitých směrech. Přítomnost ledových krystalů majících hexagonální dvoujehlanový tvar je potom považována za příznak přítomnosti 10 AFP. Tento způsob je například popsán pro testování aktivity AFP extracelulárního ozimého žita v patentové přihlášce WO 92/22581 (University of Waterloo).

15 Čtvrtou vlastností AFP je jejich schopnost zamezit aktivitě ledových zárodečných substancí. Tato interakce mezi AFP a ledovými zárodky může mít například za následek zvýšenou termální hysterezi. Tato vlastnost je například testovány v patentové přihlášce WO 96/40973 (University of 20 Notre Dame du Lac).

25 AFP byly navrženy pro zlepšení tolerance produktu k zmrazování. V této souvislosti již bylo navrženo mnoho aplikací.

Například byly AFP navrženy pro zlepšení konzervace biologických materiálů mrazením (patentová přihláška WO 25 91/12718, Agouron Pharmaceuticals, patentová přihláška WO 91/10361, The Regents of University of California). AFP byly rovněž navrženy pro zamezení unikání lipozómů, například v kosmetických nebo farmaceutických prostředcích (viz patentová přihláška WO 96/20695). Dalším možným použitím je zvýšení 30 tolerance rostlin k zmrazování prostřednictvím začlenění AFP

do těchto rostlin (nebo prostřednictvím transgenického vytvoření AFP v těchto rostlinách) (viz J. Cell, Biochem. Suppl., svazek 14e, 1990, strana 303 XP 002030248, Lee a kol, abstrakt R228). Rovněž byly navrženy rybí AFP pro použití v
5 potravinářských produktech, například v mraženém jogurtu nebo smetanové zmrzlině, (patentový spis US č. 5,620,732, Pillsbury, a patentová přihláška WO 96/11586, HSC Research and Development Limited Partnership).

10 Až doposud ale nebylo použití AFP aplikováno v komerčním měřítku. Přihlašovatelé vynálezu jsou toho názoru, že jedním z důvodů pro neexistenci komerčního využití je to, že, ačkoliv již bylo popsáno mnoho AFP, v praxi realizace ve vlastním komerčním produktu s sebou vždy nese značné problémy.

15 Přihlašovatelé vynálezu zjistili, že jedním z klíčových důvodů pro tyto problémy je to, že z tohoto velkého počtu AFP, které byly odsud popsány v literatuře, může být pouze omezená sada z AFP vhodně použita pro každou aplikaci. Přihlašovatelé vynálezu rovněž zjistili, že tento výběr
20 vhodných AFP je závislý na požadovaném použití a/nebo vlastnostech produktu, kterých má být dosaženo.

Patentová přihláška WO 90/13571 popisuje nemrznoucí peptidy vyráběné chemicky nebo rekombinačními DNA technikami.
25 AFP mohou být výhodně použity v potravinářských produktech, jako je smetanová zmrzlina. Příklad 3B popisuje modifikované tvary ledových krystalů, když je směs vody a ledu mražena na film v kombinaci s 0,01 % hmotnostním AFP.

30 Patentová přihláška WO 92/22581 popisuje AFP z rostlin, které mohou být použity pro řízení růstu ledových

krystalů ve smetanové zmrzlině. Tento dokument rovněž popisuje způsob extrakce směsi polypeptidů z extracelulárních prostorů rostlin prostřednictvím infiltrace listů extrakčním médiem bez narušení rostlinných buněk.

5 Patentová přihláška WO 94/03617 popisuje výrobu AFP z kvasinek a jejich případné použití ve smetanové zmrzlině. Patentová přihláška WO 96/11586 popisuje rybí AFP vytvořené prostřednictvím mikrobů.

10 Předkládaný vynález si klade za cíl vytvoření řešení pro shora zmiňované problémy. Zejména si předkládaný vynález klade za cíl vytvoření mražených potravinářských produktů majících relativně měkkou a současně křehkou texturu, přičemž tato textura je udržována v průběhu prodloužené doby skladování při nízkých teplotách.

15 Překvapivě bylo nyní zjištěno, že AFP mohou být vhodně začleněny do mražených potravinářských produktů pro dosažení požadovaných vlastností těchto produktů, pokud jsou podmínky zpracování měněny tak, že tvar krystalů splňuje specifické požadavky.

20 Podstata vynálezu

Ve svém prvním aspektu se tedy předkládaný vynález týká způsobu výroby mraženého potravinářského produktu zahrnujícího AFP, přičemž podmínky jsou voleny tak, že ledové krystaly v produktu mají stranový poměr od 1,1 do 1,9.

25 Pokud jsou potravinářské produkty mraženy, jsou ledové krystaly vytvářeny v celém produktu. Pokud jsou do potravinářských produktů určených k zmrazování začleněny AFP, může to vést na změnu vlastností ledové rekrystalizace.

Spojování ledových krystalů produktů obsahujících AFP může způsobit křehkost (drobivost) produktu.

Mnoho spotřebitelů má v oblibě relativně měkké a křehké potravinářské produkty nebo ingredience, jako je smetanová zmrzlina a ovocná zmrzlina. Například měkká ovocná zmrzlina může být použita jako atraktivní ingredience mražených cukrářských produktů, a rovněž tak relativně křehká smetanová zmrzlina je oblíbena velkou skupinou spotřebitelů.

Překvapivě bylo nyní zjištěno, že AFP nabízejí příležitost pro vytvoření mražených potravinářských produktů, které jsou na jedné straně relativně měkké ale zároveň křehké a na druhé straně si uchovávají zlepšené vlastnosti rekrystalizace ledu. Přihlašovatelé vynálezu zjistili, že tato velmi výhodná kombinace vlastností může být překvapivě dosažena, pokud produkt obsahuje AFP a má stranový poměr ledových krystalů v produktu, který je v rozsahu mezi 1,1 a 1,9.

Stranový poměr ledových krystalů je definován jako poměr délky a šířky ledových krystalů. Stranový poměr v rozsahu mezi 1,1 a 1,9 odpovídá zaobleným ledovým krystalům, které nemají podlouhlý tvar. Stranový poměr krystalů může být zjišťován jakýmkoliv vhodným postupem. Výhodný postup určování stranového poměru je ilustrován v příkladech v popisu níže. Výhodně je stranový poměr v rozsahu mezi 1,2 a 1,8, zvláště výhodně v rozsahu mezi 1,3 a 1,7.

Výhodně jsou mražené produkty podle předkládaného vynálezu křehké. Výhodně je minimální tloušťka vrstvy, při které může být sledováno lomivé chování, menší než 10 mm,

zvláště výhodně od 1 do 5 mm. Lomivé chování může být buď
změřeno (prostřednictvím vytvoření vrstev s různými
tloušťkami a určováním, při které minimální tloušťce dochází
k lomivému chování) nebo vypočítáno z modulu pružnosti v tahu
(Youngův modul pružnosti), jak je popsáno v příkladech v
popisu níže.

V průběhu vytváření a následného zmrazování
potravinářských produktů může několik parametrů ovlivnit
stranový poměr ledových krystalů, které mají být vytvořeny.
Příklady faktorů ovlivňujících stranový poměr jsou uvedeny
níže. Přihlašovatelé vynálezu předpokládají, že je zcela v
rámci schopností osoby v oboru znalé zvolit tyto podmínky
tak, že stranový poměr ledových krystalů bude spadat do
požadovaného rozsahu.

Jedním z faktorů ovlivňujících stranový poměr
ledových krystalů je rychlost zmrazování produktu. Obecně
řečeno vede zvyšování rychlosti zmrazování na snižování
stranového poměru ledových krystalů. V této souvislosti může
teplota zmrazování ovlivnit rychlost zmrazování a tudíž
stranový poměr ledových krystalů. Rovněž v této souvislosti
jsou tedy někdy výhodné zmrazovací procesy zahrnující
ztužovací krok, například, při teplotě pod -30° Fahrenheita
($-34,4^{\circ}\text{C}$). Skladovací teplota a doba skladování mohou stejně
tak ovlivnit stranový poměr, přičemž vyšší skladovací teploty
a/nebo delší doby skladování mají sklon způsobovat velké
stranové poměry.

Dalším faktorem ovlivňujícím stranový poměr ledových
krystalů je pohyblivost produktu v průběhu zmrazování.
Například, pokud má být zmrazena tekutá směs ovocné zmrzliny
nebo smetanové zmrzliny, povede statické zmrazování na

poměrně velký stranový poměr ledových krystalů, zatímco míchání povede na nižší stranový poměr těchto krystalů. Míchání při vyšším stříhu povede dokonce na ještě nižší stranové poměry krystalů.

5 Dalším faktorem, který ovlivňuje stranový poměr ledových krystalů, je přítomnost a množství ingrediencí. Například přítomnost ingrediencí, které mají sklon tvořit síťovou strukturu v produktu (například gumy nebo tuky), může vést na nižší stranový poměr než je stranový poměr v
10 produktech bez těchto ingrediencí. Rovněž další ingredience mohou vést na nižší stranové poměry, například vysoké úrovně tuhých látek, například vysoké úrovně cukru, mohou vést na nízké stranové poměry.

15 Nakonec také povaha a množství AFP přítomných v produktu mohou vést na změny stranových poměrů. Některé AFP pravděpodobně způsobují vytváření nízkých stranových poměrů, zatímco jiné AFP pravděpodobně způsobují vyšší stranové poměry. Vhodný test pro výběr těchto AFP je popsán v
20 příkladech v popisu níže. Změny v množství AFP mohou vést na změny ve stranových poměrech.

25 Podle svého druhého provedení se předkládaný vynález týká způsobu výroby mraženého potravinářského produktu zahrnujícího AFP, přičemž složení, podmínky zmrazování a podmínky skladování jsou voleny tak, že ledové krystaly v produktu mají stranový poměr v rozsahu od 1,1 do 1,9.

30 Způsob podle předkládaného vynálezu může být aplikován na jakýkoliv mražený potravinářský produkt obsahující AFP. Příklady vhodných produktů jsou omáčky, hotová jídla a podobně. Výhodnými potravinářskými produkty

jsou mražené cukrářské produkty, jako je smetanová zmrzlina a ovocná zmrzlina.

Přihlašovatelé vynálezu zjistili, že AFP pro použití ve způsobu podle předkládaného vynálezu mohou pocházet z velkého množství různých zdrojů, jako jsou rostliny, ryby, hmyzy a mikroorganismy. Může být použito jak přírodně se vyskytujících druhů tak i druhů, které byly získány prostřednictvím genetické modifikace. Například tedy mohou být geneticky modifikovány mikroorganismy nebo rostliny pro vytvoření AFP a tyto AFP mohou být potom použity ve způsobu podle předkládaného vynálezu.

Pro vytvoření AFP může být použito například následující techniky genetické manipulace: Vhodná hostitelská buňka nebo hostitelský organismus by byl transformován genovou konstrukcí, která obsahuje požadovaný polypeptid. Kódová nukleotidová sekvence pro polypeptid může být uložena do vhodného vektoru pro expresi, obsahujícího nezbytné prvky pro transkripci a translaci, a tak, že dojde k její expresi za vhodných podmínek (například při správné orientaci a správném čtecím rámci a s vhodnou sekvencí pro cílení a expresi). Postupy požadované pro vytvoření těchto vektorů pro expresi jsou velmi dobře známé osobám v oboru znalým.

Množství různých systémů pro expresi může být využito pro expresi kódové sekvence pro tepelně stabilní polypeptid. Tyto systémy zahrnují, ale nejsou omezeny na, bakterie, systémy kvasničných hmyzích buněk, živné systémy rostlinných buněk a rostliny, přičemž všechny tyto systémy jsou transformovány vhodnými vektory pro expresi.

Široký výběr rostlin a rostlinných buněčných systémů může být transformován konstrukcemi nukleových kyselin pro požadované polypeptidy. Výhodná provedení by mohla zahrnovat, ale nejsou omezena na, kukuřici, rajčata, tabák, mrkev, jahody, řepkové semeno a cukrovou řepu.

Pro účely předkládaného vynálezu jsou AFP odvozeny z ryb. Obzvláště výhodné je použití AFP rostlinného původu (to jest proteinů přímo získaných z rostlin nebo těchto proteinů transgenicky vytvořených prostřednictvím jiných organismů), zejména odvozených z ozimého žita nebo víceletých trav.

Pro některé přírodní zdroje mohou AFP sestávat ze směsi dvou nebo více různých AFP.

Výhodně jsou vybrány ty AFP, které mají značně výrazné vlastnosti inhibice rekrystalizace ledu. Vhodný test pro určení rekrystalizačních vlastností je naznačen v příkladech v popisu níže. Výhodně zajišťují AFP podle předkládaného vynálezu velikost ledových částic při rekrystalizaci - výhodně měřeno podle postupů uvedených v příkladech - menší než 20 μm , zvláště výhodně od 5 do 15 μm . Lze předpokládat, že malá velikost ledových krystalů kombinovaná s určitým stranovým poměrem je obzvláště výhodná pro dosažení požadovaných strukturálních vlastností.

Velmi výhodné provedení předkládaného vynálezu se týká složení produktu, která jsou volena tak, že při výrobě produktu může být využito statických podmínek při zmrazování, zatímco je ještě dosaženo stranového poměru, který byl definován výše.

Příklady takovýchto potravinářských produktů jsou: mražené cukrářské směsi, jako jsou směsi pro smetanovou

zmrzlinu a směsi pro ovocnou zmrzlinu, které jsou určeny pro skladování při teplotě okolí nebo při chladírenských teplotách. Vhodnými formami produktu jsou například: prášková směs, která je balena v pytli nebo v sáčkích. Uvedená směs je schopná vytvořit základ pro mražený potravinářský produkt, například po přidání vody a případně dalších ingrediencí a - případě - po provzdušnění.

Dalším příkladem vhodné směsi by mohla být kapalná směs (případně provzdušněná), která, pokud je to nezbytné, po přidání dalších komponentů a případném dalším provzdušnění může být mrazena.

Zjevnou výhodou shora zmiňovaných směsí je to, že přítomnost AFP ingredience umožňuje směsím, aby byly mrazeny za statických podmínek, například v domácím zmrazovači nebo ve zmrazovači v obchodě.

Velmi výhodně jsou tyto směsi baleny v uzavřených kontejnerech (například kartónech, pytlích, krabicích, plastových kontejnerech a podobně). Pro jednu dávku nebo porci bude velikost balení obecně od 10 do 1000 g. Pro více dávek mohou být vhodná balení o velikosti až 500 kg. Obecně se velikost balení bude pohybovat od 10 g do 5000g.

Jak je uvedeno výše, výhodnými produkty, ve kterých je použito AFP, jsou mražené cukrářské produkty, jako je ovocná zmrzlina nebo smetanová zmrzlina. Výhodné množství AFP je od 0,0001 do 0,5 % hmotnostního z hmotnosti finálního produktu. Pokud je použito suchých směsí nebo koncentrátů, může být koncentrace vyšší, aby se zajistilo, že množství ve finálním mraženém produktu se bude pohybovat ve shora uvedených rozsazích.

Překvapivě bylo zjištěno, že směsi podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat velmi nízká množství AFP, zatímco stále zachovávají dobrou kvalitu.

5 Až doposud se obecně předpokládalo, že pro dosažení přijatelných zlepšení rekrytalizačních vlastností jsou požadována poměrně vysoká množství AFP. Důvodem pro tato očekávání je to, že se obecně předpokládá, že AFP působí na značné podíly povrchu ledových krystalů a tudíž musí být přítomny v relativně velkých množstvích, například 0,01 %
10 hmotnostního nebo více, pro dosažení uspokojivého účinku.

Překvapivě bylo nyní zjištěno, že zlepšených rekrytalizačních vlastností mražených produktů a zvýšené teplotní tolerance může být dosaženo již tehdy, když je
15 použito nízkých množství AFP.

Překvapivě bylo nyní zjištěno, že množství AFP může být nízké až od 0,1 do 50 ppm, přičemž jsou ještě zajištěny odpovídající rekrytalizační vlastnosti a teplotní tolerance mražených cukrářských produktů. Ačkoliv si přihlašovatelé vynálezu nepřejí být vázáni jakoukoliv teorií, může být
20 důvodem pro tuto skutečnost to, že interakce mezi pevnými látkami v mraženém cukrářském produktu a AFP zajišťuje vynikající mechanismus pro inhibici růstu krystalů. Zvláště výhodně se množství AFP pohybuje od 1 do 40 ppm, obzvláště
25 výhodně od 2 do 10 ppm.

Pro účely předkládaného vynálezu zahrnuje termín mražený cukrářský produkt mléko obsahující mražené cukrářské výrobky, jako je smetanová zmrzlina, mražený jogurt, šerbet, ledové mléko a mražený pudink, ovocné zmrzliny, granity a
30 mražené ovocné dřeně a podobně. Pro některé aplikace je

použití AFP v mražených zakysaných potravinářských produktech méně výhodné.

Výhodně je množství pevných látek v mraženém cukrářském produktu (například cukr, tuk, příchutě a podobně) větší než 30 % hmotnostních, zvláště výhodně od 40 do 70 % hmotnostních.

Ve velmi výhodném provedení předkládaného vynálezu jsou použita měkká a křehká mražená cukrářská složení pro vytvoření kontrastu v textuře mraženého cukrářského produktu. Výhodně takové mražené cukrářské produkty obsahují, jako diskrétní prvky v jejich struktuře, směsi obsahující AFP podle předkládaného vynálezu. Například relativně tvrdé jádro smetanové zmrzliny může být potaženo tenkou vrstvou směsi podle předkládaného vynálezu, čímž se zajistí relativně měkká, ale křehká vnější vrstva obklopující jádro ze smetanové zmrzliny. Dalším provedením by mohlo být začlenění směsi podle předkládaného vynálezu jako příměs do mražených cukrářských produktů. Třetím provedením by mohlo být střídání vrstev smetanové zmrzliny se směsí podle předkládaného vynálezu pro vytvoření tenkých měkkých, ale křehkých vrstev střídajících se s vrstvami smetanové zmrzliny.

Příklady provedení vynálezu

Příklad I

Izolace AFP z ozimého žita

Ozimé žito (Halo variety) bylo posekáno v lednu (průměrná teplota v tomto měsíci byla 3,5°C, což zajišťovalo vhodnou aklimatizaci rostlin na chlad). Tkáň byla rychle převezena do laboratoře pro další zpracování a promyta vodou pro odstranění nečistot.

400 g odřezků bylo homogenizováno při teplotě okolí v mísidlu Waring s 800 g vody, dokud nebyla listová tkáň zcela rozrušena. Prostřednictvím filtrace skrz 4 vrstvy mušelínu byla shromážděna šťáva bohatá na AFP.

5 Tato šťáva bohatá na AFP byla potom podrobena teplotní úpravě varem šťávy po dobu 10 minut. To způsobilo usazování proteinu, zatímco AFP pro použití podle předkládaného vynálezu zůstal v roztoku. Část plovoucí na povrchu byla oddělena od usazeniny prostřednictvím odstředění
10 při 15 000 g po dobu 20 minut nebo prostřednictvím další filtrace skrz mušelín.

AFP mohly být izolovány z části plovoucí na povrchu sublimačním sušením.

15 Příklad II

Izolace AFP z trávy

Smíchaná travová tkáň (obsahující *Poa trivialis*,
20 *Lolium perenne*, *Holcus lanatus* a *Bromus sterilis*) byla posekána v lednu (průměrná teplota v tomto měsíci byla 3,5°C, což zajišťovalo vhodnou aklimatizaci rostlin na chlad). Trávová tkáň byla rychle převezena do laboratoře pro další zpracování a promyta vodou pro odstranění nečistot.

25 500 g travových odřezků bylo vloženo do mikrovlné trouby o výkonu 650 Wattů a ohříváno při plném výkonu po dobu 5 minut, čímž byla teplot zvýšena na 85 až 100°C. travové odřezky byly potom ochlazeny na teplotu okolí.

Po tomto ohřívacím kroku byla z odřezků
30 prostřednictvím filtrace oddělena šťáva bohatá na AFP. Hmota

09.04.99

byla kontinuálně míchána po dobu 5 minut za přítomnosti stejného objemu vody a potom protlačována skrz 3 vrstvy mušelinu.

5 Část plovoucí na povrchu mohla být sublimačně sušena pro izolaci AFP.

Příklad III

10 Mixováním byl vytvořen premix pro výrobu smetanové zmrzliny:

	Ingredience	% hmotnostní
	sušené odstředěné mléko	11,39
	sacharóza	3,14
15	maltodextrin (MD40)	4
	kukuřičný sirup 63DE	20,71
	mléčný tuk	9
	monoglycerid (palmitát)	0,45
20	vanilín	0,01
	karubová guma	0,07
	guarová guma	0,05
	karagén	0,02
25	mikrokrystalická celulóza	0,24
	želatina	0,14
	AFP (podle příkladu I*)	0,01 nebo žádný
		(kontrolní)
30	voda	zbytek do 100 %

* Poznámka - AFP je přidán jako koncentrovaný roztok; procentní množství označuje množství AFP.

Tato směs byla vhodně uskladněna při teplotě okolí, například v plastovém kontejneru.

5

Směs byla potom šlehána běžným domácím mixérem na zvětšení objemu přibližně 100%, načež následovalo statické zmrazování v domácím zmrazovači.

10

Po dvou měsíčním skladování měla směs podle předkládaného vynálezu znatelně lepší texturu než kontrolní vzorek:

Příklad IV

15

Mixováním byl vytvořen kapalný premix pro výrobu smetanové zmrzliny:

20

25

30

Ingredience	% hmotnostní
sušené odstředěné mléko	10
sacharóza	13
maltodextrin (MD40)	4
karubová guma	0,14
mléčný tuk	8
monoglycerid (palmitát)	0,3
vanilín	0,01
AFP (podle příkladu II*)	0,01 nebo žádný (kontrolní)
voda	zbytek do 100 %

* Poznámka - AFP je přidán jako koncentrovaný roztok; procentní množství označuje množství AFP.

Příklad V

5

Byla vyrobena smetanová zmrzlina zmrazením a provzdušněním na 70% zvětšení objemu směsi podle příkladu IV:

10

Vzorky obou produktů byly vyváženy při teplotě -18°C ve skříní Prolan s řízeným prostředím po dobu přibližně 12 hodin. Byla připravena mikroskopická sklička rozetřením tenké vrstvy smetanové zmrzliny ze středu tenkých skleněných destiček.

15

Každé skličko bylo přeneseno do mikroskopického bloku s řízenou teplotou (při teplotě -18°C), kde byly shromážděny obrazy ledových krystalů (kolem 400 ledových monokrystalů) a přenášeny prostřednictvím video kamery do systému pro uchovávání a analýzu obrazů.

20

Uložené obrazy ledových krystalů byly ručně vyznačeny prostřednictvím obtažení obvodu, což potom vyznačilo celý krystal. Obrazy vyznačených krystalů byly potom měřeny s použitím softwarového vybavení pro obrazovou analýzu, které vypočítalo počet obrazových bodů nutných pro dokončené nejdelší přímky (délka), nejkratší přímky (šířka), a stranového poměru (délka/šířka).

25

Byl vypočítán průměrný stranový poměr pro krystaly.

Pro kontrolní vzorek byl stranový poměr 1,45.

Pro vzorek obsahující AFP byl stranový poměr 1,7.

30

Příklad VI

Křehkost smetanové zmrzliny podle příkladu IV byla zjišťována prostřednictvím výpočtů lomivého chování smetanové zmrzliny. Byl změřen modul pružnosti v tahu (Youngův modul pružnosti) s využitím 3-bodového ohybového testu.

Modul pružnosti v tahu byl změřen připravením pásů smetanové zmrzliny, jejich vyvážením po dobu 18 hodin ve skříni zmrazovače a přenesením do skříně s řízenou teplotou. Pásky byly uloženy na 3-bodové ohybové zařízení, jak je popsáno v Handbook of Plastics Test Methods (druhé vydání), vydavatel R.P. Brown, George Godwin Ltd, 1981. Testování vzorků bylo prováděno bezprostředně s rychlostí deformace 50 mm/min. Ze silové deformační křivky, byl změřen počáteční sklon a ten byl použit pro výpočet modulu pružnosti v tahu podle následujícího vztahu:

$$\text{modul pružnosti v tahu (pa)} = \text{sklon} \cdot L/4 \cdot B \cdot W$$

kde L = rozpětí ramena (110 mm), B = šířka vzorku, W = výška vzorku.

Obvykle bylo testováno osm vzorků pro zjištění průměrné hodnoty modulu pružnosti v tahu.

S použitím výpočtů popisovaných v Williams & Cawood, Polymer Testing 9, 15-26 (1990) mohla být vypočítána houževnatost při lomu.

Výsledky byly následující: Pro kontrolní vzorek byla vypočítána tloušťka 966 m jako nezbytná pro dosažení křehké vrstvy. pro vzorek obsahující AFP byla křehkost (lomivé

chování) zjištěna již při 3 mm. To zcela zjevně ukazuje na zlepšenou křehkost produktu podle předkládaného vynálezu. Produkty obsahující AFP byly relativně tvrdé.

5

Příklad VII

Tento příklad popisuje metodologii pro výběr těch AFP, které ovlivňují tvorbu tvarů ledových krystalů, jak je výhodné podle předkládaného vynálezu.

10

Růst ledových krystalů za obvyklých okolností probíhá podél a-osy krystalu. Pokud jsou přítomny AFP je růst změněn. Toto selektivní ovlivňování tvaru krystalu může být vysvětleno skutečností, že AFP mají sklon se vázat k určitým částem ledového krystalu, přičemž, když se toto děje, brání tak růstu ledového krystalu v určitých směrech. Vázání může například probíhat v hranolových rovinách (kolmých k a-ose) nebo v jehlanových rovinách (vystupujících z těchto rovin).

15

20

Přihlašovatelé vynálezu zjistili, že AFP, které ovlivňují vytváření stranových poměrů podle předkládaného vynálezu, mohou být nalezeny prostřednictvím výběru těch AFP, které mají sklon se vázat na jehlanové roviny. Metodologií pro výběr těchto specificky se vázajících AFP může být jakákoliv vhodná metodologie. Vhodný test využívá tak zvaný "experiment růstu hemisféry monokrystalu ledu", který je založen na technice popsané v Knight C.A., C.C. Cheng a A.L. DeVries, Biophys. J. 59 (1991, 409-418, Adsorption of α -helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes.

25

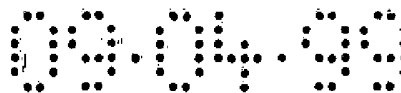
30

Dobře izolovaná 5 litrová plastová kádinka byla naplněna deionizovanou vodou a uložena do skříně s řízenou teplotou při teplotě 1°C . Potom byla pomalu zmrazováno ze shora. Po dvou dnech pokryl kádinku monokrystal ledu
5 přibližně 4 cm silný. Krystalografická orientace tohoto monokrystalu byla určena prostřednictvím rentgenové rozkladové metody pro monokrystal. Kostky ledu, s rozměrem přibližně 2 cm, byly řezány z tohoto velkého monokrystalu tak, že jeden povrch byl paralelní s hranolovou rovinou a
10 druhý povrch byl paralelní se základní rovinou. Byly tudíž vytvářeny orientované monokrystaly ledu.

Bylo použito přístroje sestávajícího z mosazného chladicího prstu (průměr přibližně 1 cm), na který byl namrazen orientovaný zárodečný krystal. Zárodečný krystal byl
15 nejprve vybrán tak, aby mohl být nasazen kolem chladicího prstu. Potom bylo cirkulováno skrz chladicí prst chladicí médium a zárodečný krystal se velmi rychle k chladicímu prstu přimrazil.

Chladicí prst se zárodečným krystalem byl potom ponořen do izolované 100 mililitrové kádinky obsahující roztok testovaného materiálu. Počáteční teplotou roztoku byla teplota místnosti (-18°C) a jediné chlazení bylo zajišťováno chladicím prstem. Zpočátku se zárodečný krystal částečně roztavil, ale potom narostl do hemisféry monokrystalu. Po
25 několika hodinách (6 až 8) byla vytvořena hemisféra s průměrem 5 až 7 cm.

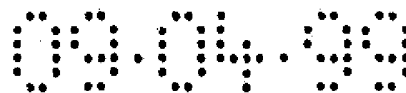
Tento experiment byl proveden s různými roztoky AFP. Použité roztoky AFP přitom měly koncentraci AFP 10^{-3} mg/ml.



Hemisféra byla potom sejmuta z chladicího prstu a přesunuta do skříně s řízenou teplotou při teplotě -15°C . Povrch byl oškrábán a hemisféra byla ponechána ve skříně alespoň přes noc (16 hodin nebo více). V celé komoře byl cirkulován vzduch prostřednictvím integrálního větráku. V průběhu této doby docházelo k odpařování povrchových vrstev ledu. Povrch ledové hemisféry se tudíž stával takovým, že měl hladký zrcadlový povrch. Ovšem pro hemisféru obsahující AFP byly na povrchu patrné drsné skvrny. tyto skvrny odpovídaly skvrnám, kde AFP byly vázány na povrch hemisféry. Velké molekuly AFP bránily odpařování ledových molekul a tak se vytvořila drsná síť molekul AFP na povrchu v oblastech povrchu, kde docházelo k preferenčnímu vázání k ledu. Protože orientace hemisféry je známá a úhlová vzdálenost mezi těmito drsnými skvrnami a směry základní a hranolové roviny může být změřena prostřednictvím optického goniometru, může být určena povaha vazební roviny.

Uvedený test může být použit pro výběr těch AFP, které mají sklon se vázat k jehlanovým rovinám. Například AFP z příkladu I a z příkladu II mají sklon se vázat k jehlanovým rovinám. Rovněž velké množství jiných rostlinných výtažků má sklon se vázat k jehlanovým rovinám.

Mělo by být zcela v rozsahu znalostí a schopností osoby v oboru znalé, aby použila výše popsany test pro zjištění těch AFP, které mají sklon způsobovat vytváření velkých stranových poměrů ledových krystalů. Pro testování jejich vhodnosti v mražených produktech podle předkládaného vynálezu může být vyroben vlastní produkt a může být určen stranový poměr krystalů v tomto produktu.



Příklad VIII

Test pro zjišťování velikosti ledových krystalů po rekrytalizaci.

5 Vzorek roztoku obsahujícího AFP ve vodě je nastaven na úroveň sacharózy 30 % hmotnostních (Pokud je počáteční množství sacharózy ve vzorku větší než 30 % hmotnostních, je to provedeno zředěním, pokud je počáteční množství sacharózy ve vzorku menší než 30 % hmotnostních, je to provedeno přidáním sacharózy na požadovanou úroveň.)

10 Obecně tento test může být aplikován na jakoukoliv vhodnou směs zahrnující AFP a vodu. Obecně není množství AFP v těchto testovaných směsích nějak zvlášť kritické a může být například od 0,0001 do 0,5 % hmotnostního, výhodně od 0,0005 do 0,1 % hmotnostního, zvláště výhodně od 0,001 do 0,05 % hmotnostního, například 0,01 % hmotnostního.

20 Kapička vzorku o velikosti 3 μL je položena na krycí sklíčko o průměru 22 mm. Potom je na vršek položeno krycí sklíčko o průměru 16 mm a na tento vzorek je polože 200 gramové závaží pro zajištění jednotné tloušťky vzorku. Hrany krycího sklíčka jsou utěsněny bezbarvým lakem na nehty.

25 Sklíčko je uloženo na blok mikroskopu Linkham THM 600 s řízenou teplotou. Blok je potom rychle ochlazen (50°C za minutu) na teplotu -40°C pro vytvoření velké populace malých krystalů. Teplota bloku je potom rychle zvýšena (50°C za minutu) na -6°C a je udržována na této teplotě.

30 Ledová fáze je sledována při teplotě -6°C s použitím mikroskopu Leica Aristoplan. Polarizované světelné podmínky ve spojení s lambda destičkou byly použity pro zvýšení kontrastu ledových krystalů. Stav ledové fáze (velikost

ledových krystalů) je zaznamenán prostřednictvím 35 mm
mikrofotografie při T=0 a T=1 hodina. Průměrná velikost
částic (vizuální určení, číselný průměr) pod 20 μm , zvláště
výhodně mezi 5 a 15 μm indikuje výhodné AFP pro použití v
5 produktech podle předkládaného vynálezu.

Zastupuje :

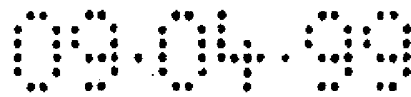
10

15

20

25

30



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby mraženého potravinářského produktu zahrnujícího nemrznoucí polypeptidy, v y z n a č u j í c í s e t í m , že podmínky se zvolí tak, že ledové krystaly v produktu mají stranový poměr, definovaný jako délka dělená šířkou, od 1,1 do 1,9.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že podmínky pro ovlivnění stranového poměru se zvolí ze skupiny sestávající z rychlosti zmrazování, pohyblivosti produktu v průběhu zmrazování, skladovací teploty a skladovací doby, složení produktu a povahy a množství nemrznoucích polypeptidů a kombinací těchto podmínek.
3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že mraženým potravinářským produktem je mražený cukrářský produkt.
4. Mražený cukrářský produkt zahrnující od 0,0001 do 0,5 % hmotnostního nemrznoucích polypeptidů, v y z n a č u j í c í s e t í m , že má stranový poměr ledových krystalů od 1,1 do 1,9.
5. Mražený cukrářský produkt podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že nemrznoucí polypeptidy jsou přednostně vázány k jehlanovým rovinám ledových krystalů.
6. Mražený cukrářský produkt mající kontrast textury, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje diskrétní prvky cukrářského produktu definovaného v nároku 4.

7. Mražený cukrářský produkt podle nároku

6, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje tenké
vrstvy smetanové zmrzliny střídající se s tenkými vrstvami
ovocné zmrzliny, přičemž vrstvy ovocné zmrzliny zahrnují od
5 0,0001 do 0,5 % hmotnostního nemrznoucích polypeptidů a mají
stranový poměr ledových krystalů od 1,1 do 1,9.

8. Zmrzlinová směs pro použití při výrobě mraženého
cukrářského produktu definovaného v nároku 4.

10 9. Zmrzlinová směs podle nároku 8, v y z n a č u j í c í
s e t í m , že výroba zahrnuje provzdušnění a statické
zmrazování.

Zastupuje :

15

20

25

30