



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **324487**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A23J 3/34 (2006.01)

A23J 3/00 (2006.01)

A23L 1/325 (2006.01)

A61K 38/01 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20021877	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2000.10.20 PCT/IS00/00012
(22)	Inng.dag	2002.04.19	(85)	Videreføringsdag	2002.04.19
(24)	Løpedag	2000.10.20	(30)	Prioritet	1999.10.20, IS, 5225
(41)	Alm.tilgj	2002.06.19			
(45)	Meddelt	2007.10.29			
(73)	Innehaver	Nordur EHF, Brunavegi 8, 104 Reykjavik, IS			
(72)	Oppfinner	Jon Bragi Bjarnason, Skildinganesi 29, 101 Reykjavik, IS			
		Bergur Benediktsson, c/o Nordur EHF, Brunavegi 8, 104 Reykjavik, IS			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO			

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåte for fremstilling av proteinhydrolysat med et proteolytisk preparat fra en Gadidae-art, et proteinhydrolysat oppnådd derved, produkter omfattende slikt hydrolysat og en fremgangsmåte for anvendelse av hydrolysat.			
(56)	Anførte publikasjoner	CA-A-1313835, RU-A-2055482			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte for enzymatisk oppnåelse av proteinhydrolysater for humant forbruk, dyrefôr og kosmetikk. Fremgangsmåten involverer anvendelsen av et proteolytisk preparat utledet fra fisk, slik som torsk (*Gadus morhua*), for å oppnå hydrolysater som har en ikke-bitter smak og som opprettholder fargen og aromaen til det proteininnholdende materialet som hydrolyseres: f.eks. når proteininnholdende materiale fra marine organismer eller deler derav, slik som fisk, reker, hummer eller annen sjømat ifølge oppfinnelsen hydrolyseres produseres det et proteinhydrolysat som har organismens karakteristiske naturlige smak. Det tilveiebringes også matprodukter inneholdende hydrolysatene ifølge oppfinnelsen, slik som en suppe, saus, ost, HVP, kjøttstrakt og smaksmidler, buljong, paté, mousse, stekedeig, "orly"-deig og kaker.

Teknisk område

Den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for å hydrolysere proteiner, proteinhydrolysater oppnådd ved hjelp av fremgangsmåten og matprodukter og ikke-matprodukter omfattende hydrolysaterne ifølge oppfinnelsen.

5 Bakgrunn og kjent teknikk

Fremgangsmåter for å hydrolysere proteiner er velkjent i den kjente teknikk. Vanligvis fremstilles hydrolysater kjemisk ved hjelp av hydrolyserende protein eller proteinaktig materiale, slik som f.eks. avfettet soyamel eller glutenhvete med saltsyre under refluxbetingelser. De resulterende hydrolysater er billige og kan ha tilfredsstillende organoleptiske egenskaper. Imidlertid er kjemisk hydrolyse forbundet med ikke-spesifikke sidereaksjoner som forårsaker f.eks. dannelsen av klorhydriner, slik som monoklordihydroksypropanoler (MCDP'er) og diklorpropanoler (DCP'er), og hvis nærvær er uønsket i matprodukter. Matindustrien krever mildere fremgangsmåter for å modifisere matprodukter, redusere behovet for ubehagelige kjemiske reaksjonsbetingelser og fjerne biprodukter og restmidler.

Alternativt kan protein eller proteinaktig materiale hydrolyseres enzymatisk. Den relevante proteinkilden utsettes vanligvis først for en (delvis) hydrolyse med én eller flere egnede endoproteaser. Deretter kan de resulterende proteinfragmenter degraderes fullstendig eller delvis til individuelle aminosyrer eller dipeptider eller tripeptider ved anvendelse av eksopeptidaser. Alternativt kan endopeptidaser og eksopeptidaser fungere simultant i en enzymatisk blanding som resulterer i en tilsvarende fullstendig eller delvis degradering av proteinet eller det proteinaktige materialet.

Et fundamentalt problem ved den enzymatiske hydrolysen av proteiner og proteinaktig materiale er dannelsen av en bitter smak som følge av dannelsen av korte peptidfragmenter. Den bitre smaken antas å være et resultat av kløyving av proteiner ved aminosyrer med hydrofobe sidekjeder hvilket resulterer i dannelsen av peptider med eksponerte hydrofobe sidekjeder som vanligvis er utilgjengelige i proteiner og lengre peptider som følge av deres tertiære struktur.

For å løse dette problemet foreslås det i teknikkens stand å anvende spesifikke proteaser som begrenser graden av hydrolyse og som oppnår foretrukne terminale sidekjeder. F.eks. beskriver US 5 866 357 anvendelsen av en Glu/Asp-spesifikk protease for fremstilling av hydrolysater, eventuelt ved anvendelse av en ytterligere spesifikk protease. I WO 98/27827 foreslås det videre med det formål å løse dette problemet å anvende en proteolytisk enzymblanding som omfatter kun én eksopeptidase hvori eksopeptidasen fremstilles ved anvendelse av rDNA-teknikker og som kan anvendes i kombinasjon med én eller flere egnede endopeptidaser, slik som Fromase TM (Gist-Brocades, France) og Maxatase TM (Genencor International, Belgium). US 5 532 007 beskriver anvendelsen av en kombinasjon av

- rensede enzymer, en nøytral protease som fremstilles ved hjelp av en bacillusstamme og en alkalisk protease fremstilt ved hjelp av en bacillusstamme. Referansen angir at rått kjøtt fortrinnsvis behandles med proteaser som eksklusivt har endo-aktiviteter for det formål ifølge den beskrevne oppfinnelse å oppnå
- 5 kjøtthydrolysater. Fremgangsmåter beskrevet i WO 94/25580 anvender et proteolytisk enzympreparat utledet fra soppen *Aspergillus oryzae* (Flavorzyme™) omfattende en blanding av endopeptidaser og eksopeptidaser.
- Alternativt foreslår EP 0 823 998 A2 den enzymatiske hydrolyse av røkt kjøtt som protein eller proteinaktig materiale for dannelselse av et proteinhydrolysat som ikke
- 10 smaker bittert. I denne fremgangsmåten er det foretrukket at kun ett enzym, fortrinnsvis en nøytral eller en alkalisk protease med en endopeptidasevirkning, f.eks. Pescalase (Gist Brocades), Alcalase (Novo Nordisk) eller Promod 31 (Biocatalysts) anvendes for hydrolysen.
- I WO 89/10960 foreslås anvendelsen av komplekse enzymblandinger fra krill for å
- 15 modifisere protein-, peptid- og/eller lipidbestanddeler i biologisk materiale i industrielle prosesser. Enzympreparatene som blir beskrevet fremstilles ved hjelp av inkubering av hele oppbløtte antarktiske krill (*Euphasia superba*) ved 50°C i 20 timer. Eksempler på ulike anvendelser beskrives, slik som hydrolyse av fisk og kjøtt. Krillenzympreparatene sies å inneholde ulike proteaser og lipolytiske
- 20 enzymer, f.eks. en betraktelig mengde av fosfolipaser. Slike preparater synes ikke å ha blitt anvendt i en kommersiell skala for produksjon av hydrolysater med matvarekvalitet. Det er å bemerke at i alle disse referansene fra den kjente teknikk oppnås hydrolysater ved hjelp av enzymatisk inkubering ved 50-65°C.
- WPI sammendrag AN 1996-495762 (RU-C-2 055 482) beskriver anvendelsen av
- 25 pyllritiske enzymer fra laks for fremstilling av protein-nukleinhydrolysater, men lavtemperaturhydrolyse er ikke omfattet eller foregrepet. I US 3 852 479 beskrives en fremgangsmåte for fremstilling av proteinhydrolysater med et høyt glutaminsyreinnhold ved hjelp av hydrolysering av proteinmaterialet med en glutaminase sammen med et proteolytisk enzym. Også her er temperaturer over
- 30 50°C foretrukket. I CA 1313835 beskrives anvendelsen av svinetrypsin eller Enzeco AP-1™-protease (alkalisk fosfatase av bakteriell opprinnelse) for enzymatisk ekstraksjon av karotenprotein fra krepseavfall. Ingen av disse referansene omfatter anvendelsen av proteaser fra *Gadidae*-arter for fremstilling av proteinhydrolysater eller foreslår at slike eller andre lignende enzympreparater ville være effektive ved
- 35 lave temperaturer.
- For fremstillingen av mange fremstilte delikate matprodukter med opprinnelse fra eller tilsvarende naturlige produkter, slik som f.eks. sjømat supper og sauser, behøver smaksekstrakter ikke kun å ha ikke-bitteregenskaper. De må også ha den samme eller svært like smaken som den karakteristiske smaken til det naturlige
- 40 produktet. De fleste kvalitetsrestauranter fremstiller fortsatt ekstrakter for f.eks.

skalldyrsuppe ved anvendelse av konvensjonelle fremgangsmåter for å danne suppekraft fra skjell, klør, hoder osv. Enzymatisk fremstilte smaksmidler har vanligvis ikke blitt anvendt i stor grad ettersom de ikke synes å tilveiebringe en tilfredsstillende naturlig smak.

- 5 Lukten av fisk og andre sjømatarter fremstilles ved hjelp av komplekse blandinger av flyktige forbindelser og er svært sensitive for betingelser som påvirker friskheten til arten. Artsrelaterte luktforbindelser i fersk fisk er tilstede i svært små nivåer, og selv om de er tilstede i svært små mengder (ppb) påvirker de fortsatt fiskeartens totale aroma og endringer i deres konsentrasjoner påvirker drastisk den totale
- 10 aromaen. Disse forbindelser inkluderer umettede karbonylforbindelser og alkoholer med 6, 8 eller 9 karbonatomer. Bromfenoler i lave konsentrasjoner har også blitt assosiert med den naturlige, sjø-, jod-, marinlignende lukten til sjømat. Mikrobielle forbindelser dannes mikrobielt gjennom ødeleggelsen av fisken. Disse inkluderer kortkjedede alkoholer, ketoner, aldehyder, aminer, svovelforbindelser, aromatiske
- 15 forbindelser og syrer og er hovedsakelig et resultat av degradering av amino- og fettsyrer. Proteolytisk aktivitet vil øke ødeleggelsen ettersom små peptider og frie aminosyrer er næringsstoffer for bakterier og resulterer i dannelsen av illeluktende metabolitter. Nøye utvelgelse av betingelser for hydrolysen av sjømat og beslektede proteinmaterialer er derfor svært kritisk for produksjonen av slike hydrolysater for
- 20 matprodukter med ønsket organoleptiske egenskaper og høy kvalitet. Det er sannsynlig at forlenget inkubering ved temperaturer i området 50-65°C vil degradere den samlede smaken og aromatiske karakteren til det proteininnholdende materialet som hydrolyseres, spesielt fra fisk og andre sjømatmaterialer som følge av tap av flyktige forbindelser og fremstilling av uønskede biprodukter.
- 25 Det er et behov for fremgangsmåter for hydrolysering av proteiner under milde betingelser som gir høyt utbytte og hydrolysater med fortreffelige organoleptiske egenskaper, spesielt proteinhydrolysater som har bevart den naturlige smaken til det proteininnholdende utgangsmaterialet slik som sjømat, men som ikke har den bitre smaken som oppstår gjennom konvensjonell hydrolyse av proteininnholdende
- 30 materialer. Det har blitt funnet at fremgangsmåter for å oppnå hydrolysater ved lave enzyminkuberingstemperaturer resulterer i at råmaterialets ferskhets og smak (flyktige smaksmidler) kan bevares, antagelig som følge av et redusert nivå av sidereaksjoner og mikrobiell aktivitet og at et relativt ikke-spesifikt enzympreparat utledet fra fisketarm og oppnåelig med økonomiske og tekniske enkle
- 35 fremgangsmåter kan anvendes for effektiv hydrolyse av proteinaktive materialer for å oppnå hydrolysater som ikke er bitre og som opprettholder det proteininnholdende råmaterialets fortreffelige smaksegenskaper. Et spesielt fordelaktig aspekt ved den foreliggende oppfinnelse er det lave temperaturområdet hvorved slike enzympreparater er proteolytisk aktive. Det er tenkelig at det lave
- 40 temperaturområdet hvorved fremgangsmåtene og prosessen fortrinnsvis utføres er en viktig faktor som bidrar til de oppnådde produktenes organoleptiske egenskaper.

Sammendrag av oppfinnelsen

- I et første aspekt tilveiebringer følgelig den foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte for å fremstille et proteinhydrolysat fra et naturlig proteininnholdende råmateriale, hvori fremgangsmåten omfatter trinnene: a)
- 5 fremstilling av en vandig velling omfattende 1-100 vekt% proteininnholdende materiale; b) inkubering av vellingen med et proteolytisk preparat utledet fra en *Gadidae*-art; c) agitering av vellingen i 0,25-48 timer ved en temperatur i området fra 0 til 60°C; d) eventuelt inaktivere den proteolytiske blandingen; og e) eventuelt separere løsningsfraksjonen fra fast materiale.
- 10 I et ytterligere aspekt tilveiebringes et proteinhydrolysat som er oppnåelig ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.
- I enda et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et matprodukt som omfatter et proteinhydrolysat som er oppnåelig ifølge oppfinnelsen.
- Oppfinnelsen tilveiebringer i enda et ytterligere aspekt en fremgangsmåte for å
- 15 fremstille et matprodukt omfattende trinnene: å oppnå et proteinhydrolysat ifølge oppfinnelsen og fremstille et matprodukt ved anvendelse av hydrolysatet.
- I et annet aspekt ifølge oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for fremstilling av et smakspreparat, hvori fremgangsmåten omfatter trinnene a)
- 20 fremstilling av en vandig velling omfattende 1-100 vekt% proteininnholdende materiale; b) inkubering av vellingen med et proteolytisk preparat utledet fra fisk; c) agitering av vellingen i 0,25-48 timer ved en temperatur i området fra 2 til 40°C; d) eventuelt inaktivere den proteolytiske blandingen; e) separering av løsningsfraksjonen fra fast materiale; og f) konsentrering av løsningen til et tørrvektsinhold på fra 10 vekt% til 98 vekt%.
- 25 I enda et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes et ikke-matprodukt omfattende et proteinhydrolysat ifølge oppfinnelsen.
- I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å frigjøre i det minste en del av astaxantinet fra et astaxantininnholdende skalldyrmateriale hvori fremgangsmåten omfatter trinnene: klargjøring som utgangsmateriale en
- 30 vandig velling omfattende skalldyrmateriale; inkubering av vellingen med et proteolytisk preparat utledet fra en *Gadidae*-art, agitering av vellingen ved en temperatur i området fra 2-60 °C; og inaktivere den proteolytiske blandingen for å oppnå et proteinhydrolysat inneholdende, i forhold til utgangsmaterialet, et høyt innhold av frigjort astaxantin.
- 35 **Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen**
- De proteolytiske preparater som anvendes ifølge oppfinnelsen utledes fra tarmen til *Gadidae*-arter, som derfor gir dem uvanlige egenskaper slik som spesielt en høy aktivitet ved lave temperaturer. Den detaljerte karakteriseringen av et proteolytisk preparat fra torsketarm (*Gadus Morhua*) har vist at preparatet omfatter flere

proteolytiske komponenter. Det har blitt observert at preparatet omfatter i det minste fem eller flere proteolytiske enzymkomponenter eller grupper. Disse proteolytiske komponentene eller gruppene omfatter endopeptidasetrypsin, i det minste tre isozymer (Ásgeirsson et al., 1989), kymotrypsin, i det minste to isozymer (Ásgeirsson og Bjarnason, 1991), og elastase, i det minste et isozym (Ásgeirsson og Bjarnason, 1993), og eksopeptidasene til aminopeptidase- og karboksypeptidasetyperne.

Det har blitt funnet at slike preparater ikke bare tjener som en anvendelig kilde for de ovenfor individuelle enzymkomponenter men også overraskende at de effektivt kan anvendes for å fremstille proteinhydrolysater med uvanlige egenskaper, dvs. som ikke er bitre og opprettholder smaksegenskapene til det proteininnholdende råmaterialet.

Som nevnt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille et proteinhydrolysat fra et naturlig proteininnholdende råmateriale. Fremgangsmåten omfatter som et første trinn fremstillingen av en vandig velling omfattende 1-100 vekt% proteininnholdende materiale, fortrinnsvis 10-100 vekt%, slik som f.eks. i området fra 25-100 vekt%. Materialet kan forhåndsbehandles med konvensjonelle midler slik som mekanisk makulering, kutting, hakking eller maling. Innholdet i det proteininnholdende materialet i vellingen avhenger av vanninnholdet og materialets struktur. F.eks. er det ikke nødvendig å tilsette vann ved hydrolysering av kjøtt fra hvit fisk med et tørrvektsinhold på 18-25 %. For hydrolysering av materialet med et høyere vanninnhold tilsettes imidlertid vann til vellingen for å oppnå et tørrvektsinhold i vellingen på 1-30 %, fortrinnsvis 5-25 %, slik som 10-20 %.

Vellingen inkuberes deretter med et proteolytisk preparat utledet fra fisk og vellingen agiteres i 0,25-48 timer, fortrinnsvis 1-10 timer, mer foretrukket 1-6 timer, inkludert 2-4 timer. Inkuberingen utføres ved en hvilken som helst egnet temperatur hvorved enzympreparatet ikke varmeinaktiveres, dvs. i området fra 0°C til 60°C, men fortrinnsvis fra 2 til 40°C, inkludert 5-35°C og mer foretrukket i området fra 5-30°C, slik som 10-25°C, inkludert 50°C, 17°C og 20°C. I visse utførelsesformer kan et spesielt lavt temperaturområde være ønskelig, slik som f.eks. 2-10°C, inkludert 2-8°C. Vanligvis kompenseres lavere inkubasjonstemperaturer med lengre inkubasjonstid eller en høyere relativ konsentrasjon av det proteolytiske preparatet eller begge deler. Lave inkuberingstemperaturer, slik som temperaturer under 40°C, spesielt under 25-30°C er muligens en viktig faktor som bidrar til opprettholdelsen av smaken og aromaen til ferske, delikate proteininnholdende materialer som kan anvendes som matvarehydrolysater, som diskutert ovenfor.

Ifølge etablert praksis kan proteasene i inkuberingsblandingen eventuelt passende inaktiveres, slik som f.eks. ved hjelp av rask oppvarming til over 60°C, slik som til

70°C eller ved å senke inkuberingsblandings pH til en pH hvorved proteasene blir inaktivert, slik som til under pH 5 som kan ses i fig. 2 og fig. 3 for et proteolytisk preparat utledet fra torsk.

- 5 Løsningsfraksjonen inneholdende oppløste hydrolyserte peptider separeres deretter eventuelt fra fast materiale, f.eks. ved hjelp av sedimentering, filtrering eller sentrifugering. Enzyminaktivering kan eventuelt utføres etter slik separering, på løsningsfraksjonen alene eller begge fraksjoner separat.

- 10 For enkelte proteininnholdende materialer er det fordelaktig å varme materialet forut for hydrolysetrinnet for å minimalisere eventuell mikrobiell kontaminering og/eller for å inaktivere andre enzymer som medfører uønskede reaksjoner. Oppfinnerne har også funnet at når f.eks. hummerkjøtt hydrolyseres vil en kort oppvarming til en temperatur på 70-90°C eliminere fenyloksidaseaktiviteten som ellers gjør hummerkjøtt og det resulterende hydrolysatet mørkere.

- 15 Som et ytterligere eventuelt trinn kan løsningsfraksjonen konsentreres til et ønsket tørrstoffinnhold ved hjelp av hvilke som helst anvendelige midler slik som fordampningsvarming under vakuum eller lyofilisering. Hydrolysatproduktets tørrstoffinnhold er hvor som helst i området fra 1-100 % avhengig av produktets ønskede form og væskeinnhold. Flytende eller halvflytende hydrolysatpreparater vil vanligvis ha et tørrstoffinnhold på 5-40 %, inkludert 15-35 %. Hydrolysatproduktet 20 kan eventuelt være i form av en gel eller en deig, eller i en fast eller halvfast form slik som f.eks. flak, en pulverform eller som komprimerte legemer, f.eks. som tabletter, stenger, kuber eller blokker.

- Inkuberingen utføres ved en pH i området fra 6 til 11, fortrinnsvis mellom 7-10. Som demonstrert med et torskeutledet proteolytisk preparat i fig. 1 og fig. 2 25 gjennomføres fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen rimelig bra selv ved heller ekstreme betingelser, dvs. ved pH-verdier i det fulle området fra 6-11.

- Det proteolytiske preparatet er utledet fra *Gadiform*-arter, inkludert *Gadidae* (torskearter og lysing). Atlantisk torsk (*Gadus morhua*) er en lett tilgjengelig og spesielt anvendelig kilde for preparatet. Andre fiskearter som anvendes som en 30 kilde for det proteolytiske preparatet i ytterligere utførelsesformer inkluderer kolje, og lyr (sei).

Foretrukne arter inkluderer spesielt de hvorfra tarmen lett kan separeres fra de andre vitale organer.

- 35 I en spesielt anvendelig utførelsesform tilveiebringes det proteolytiske preparatet ved hjelp av en fremgangsmåte omfattende trinnene: blanding av vann med fiskeinnvoller; agitere blandingen i et tidsrom på 0,5 timer eller lenger, slik som i området fra 1-10 timer, og fortrinnsvis 2-6 timer; preparering av faste rester fra løsningen, f.eks. ved hjelp av sedimentering, filtrering eller sentrifugering; og konsentrering av den vandige løsningen for å oppnå det proteolytiske preparatet.

- Fiskeinnvoller i denne betydning omfatter fisketarmer, f.eks. pylorisk caeca. I en foretrukket utførelsesform fjernes imidlertid leveren, milten, melken og mage fra innvollene forut for fremstillingen. Oppfinnerne har observert at mesteparten av de foretrukne aktive proteaser utledes fra de mindre sure tarmene og ikke den mer sure
- 5 magen. Konsentreringstrinnet utføres med hvilken som helst egnede midler velkjent for fagmannen på området, slik som f.eks. ultrafiltrering for å oppnå en ønsket aktivitet pr. volumenhet, slik som f.eks. i området fra 0,1-100 BAPNA enheter/ml målt som beskrevet i eksempel 1, mer foretrukket i et område fra 0,5-10 BAPNA U/ml, inkludert 1-5 BAPNA U/ml.
- 10 Agiteringen av vann-innvollsblandingen utføres ved en pH og temperatur hvorved stabiliteten til de ønskede proteaser ikke avtar vesentlig fra deres optimale nivå, slik som f.eks. ved en temperatur i området fra 0-20°C, og ved en pH i området 6-11. I en foretrukket utførelsesform utføres agiteringen av vann-innvollblandingen ved en pH i området fra 6 til 9, inkludert i området fra 6 til 8, slik som f.eks. 6-8, og
- 15 fortrinnsvis ved en temperatur i området fra 0 til 15°C, inkludert 0-15°C, inkludert 0-10°C, mer foretrukket 0-5°C.

- Det proteolytiske preparatet omfatter i en utførelsesform av oppfinnelsen i det minste ett enzym valgt fra gruppen bestående av trypsin, chymotrypsin, elastase, kollagenase, aminopeptidase og et karboksypeptidasetypeenzym. Fortrinnsvis
- 20 omfatter preparatet to eller flere av de ovenfor nevnte enzymer, slik som f.eks. alle enzymene. I en bestemt anvendelig utførelsesform foredles imidlertid det proteolytiske preparatet ytterligere ved hjelp av fjerning av i det minste ett av dets enzymkomponenter. Eksempel 2 viser hvordan elastase og syrinkollagenase fjernes fra et proteolytisk preparat utledet fra torsk for å oppnå et modifisert torskeutledet
- 25 enzympreparat med mange av de samme egenskapene som basispreparatet i eksempel 1.

- Det proteolytiske preparatet anvendt ifølge oppfinnelsen har fortrinnsvis en enzymatisk aktivitet i området fra 0,1 til 100 BAPNA enheter/ml, målt som i analysen i eksempel 1 heri, mer foretrukket 0,5 til 20 BAPNA enheter/ml, enda
- 30 mer foretrukket 1-10 enheter/ml, inkludert 1-5 enheter/ml. Den egnede mengde av enzympreparat som proteinmaterialvellingen inkuberes med avhenger av den spesifikke aktiviteten til enzympreparatet, det ønskede tidsområdet for hydrolyseinkuberingen og den spesielle proteinråmaterialtypen som anvendes. I en utførelsesform inkuberes vellingen med det proteolytiske preparatet ved en mengde
- 35 på 1-10000 BAPNA proteolytiske enheter/kg proteininneholdende råmateriale, fortrinnsvis 10-500 enheter/kg, inkludert 25-250 enheter/kg, slik som f.eks. 25-100 enheter/kg.

- I enda en ytterligere utførelsesform tilsettes i det minste ett ikke-fiskutledet enzympreparat til det proteolytiske preparatet utledet fra en *Gadidae*-art forut for
- 40 inkuberingen med proteininneholdende råmateriale. Slike ikke-fisk utledede

- enzympreparater inkluderer nøytrale og alkaliske proteaser slik som de kommersielt tilgjengelige proteasepreparatene NeutraseTM, AlcalaseTM og FlavorzymeTM (fr Novo Nordisk, Danmark), PescalaseTM og FromaseTM (begge fra Gist-Brocades, Frankrike), MaxataseTM (Genencor International, Belgia), og Promod 31TM (Biocatalysts, UK); lipasepreparater slik som lipase fra sopp f.eks. de kommersielt tilgjengelige lipasepreparatene PalataseTMM og PalataseTMA (begge fra Novo Nordisk, Danmark); glykolytiske preparater hvori det glykolytiske preparatet omfatter i det minste en amylase, glukonase, glutaminase, fytase, glykosidase, cellulase, chitinase eller pektinase; og enhver kombinasjon av de ovenfor nevnte enzymer.
- I en ytterligere anvendelig utførelsesform av oppfinnelsen behandles den vandige vellingen med i det minste et enzympreparat slik som f.eks. ett av de ovenfor nevnte preparater forut for og/eller etter behandlingen med det proteolytiske preparatet utledet fra en *Gadidae*-art.
- Det proteininnholdende materialet som hydrolyseres ved fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er i en utførelsesform et dyreprotein valgt fra gruppen bestående av et fiskeprotein, skalldyrprotein, melkeprotein, myseprotein, kasein, kjøttprotein, blodprotein, eggprotein, elastin og gelatin. I en annen utførelsesform er det proteininnholdende materialet et vegetabilsk protein valgt fra gruppen bestående av soyaprotein; kornprotein, f.eks. hvetegluten eller zein; rapsfrøprotein; alfalfaprotein, erteprotein, bønnelignende bønneprotein; bomullsfrøprotein og sesamfrøprotein.
- I en spesielt anvendelig utførelsesform av oppfinnelsen er det proteininnholdende materialet et materiale fra en marin organisme, slik som hel fisk, fiskekjøtt, fiskeinnvoller, fiskeskinn, fiskebein eller en hvilken som helst del eller blanding derav; eller et materiale fra en marin organisme utledet fra én eller flere kreps- eller bløtdyrarter inkludert reker, hummer, kreps, krabber, musling, østers og blåskjell hvori materialet omfatter hele dyr, kjøtt, skjell eller enhver del, blanding eller kombinasjon derav. I enda en ytterligere anvendelig utførelsesform omfatter det proteininnholdende råmaterialet proteinaktige membraner eller skinn, slik som fra fisk, fiskelever, svømmeblærer fra fisk, fiskens indre kroppshulrom, fiskeegg eller fiskemelke.
- En annen anvendelig utførelsesform anvender dyreutledet proteininnholdende råmateriale slik som fra lam, svin, oksekjøtt, kylling og kalkun, hvori materialet enten er rått eller kokt slik som ved hjelp av koking, steking eller konservering og omfatter muskelvev, sener, annet bindevev, ben, slakteavfall eller enhver del eller blanding derav.
- Det har blitt funnet at fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan anvendes i kombinasjon med en fermenteringsfremgangsmåte, dvs. hvori det proteininnholdende materialet hydrolyseres under fermenteringsbetingelser for å

- oppnå et fermentert proteinhydrolysat, og/eller hvori proteinhydrolysatet oppnådd ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen utsettes for en fermenteringsprosess. Eksempler på slike fermenteringsprosesser er prosessfermentering av fisk (f.eks. i produksjon av fiskesaus), kakaobønner eller soya (slik som ved fremstilling av soyasaus, "tempeh", "miso"). Tilsettingen av det proteolytiske enzympreparatet eller tilsetting av proteinhydrolysatet kan være anvendelig for å senke fermenteringens totale prosessid slik som i konservering av sild.
- I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen proteinhydrolysater oppnådd ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. I anvendelige utførelsesformer utledes proteinhydrolysater fra dyreprotein slik som hvilken som helst av de ovenfor nevnte. Andre utførelsesformer inkluderer proteinhydrolysater utledet fra et vegetabilsk protein slik som de tidligere nevnt.
- I et ytterligere aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringes et matprodukt, hvor matproduktet omfatter et proteinhydrolysat ifølge oppfinnelsen. Mengden av proteinhydrolysat inkorporert i matproduktet er vanligvis i området fra 0,1-50 vekt%, slik som 0,1-5 vekt%.
- I en spesielt anvendelig utførelsesform av oppfinnelsen er proteinproduktet et smakspreparat for anvendelse i et matprodukt slik som f.eks. en suppe, en saus, en buljong, en paté, en mousse, en soufflé, en ost, stekemel, "orly"-mel og bakevarer.
- Et annet matprodukt ifølge oppfinnelsen er en ingrediens i et morsmelkerstatningsmiddel for spedbarn. Som følge av den høye hydrolysegraden som oppnås ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen kan proteinhydrolysatet ifølge oppfinnelsen fordelaktig inkorporeres i morsmelkerstatninger, siden hydrolysatet har en signifikant lavere allergenisitet enn ikke-hydrolyserte melkeproteiner.
- Enda et annet matprodukt ifølge oppfinnelsen inkluderer proteinhydrolysatet ifølge oppfinnelsen som et proteinsupplement eller for å tilveiebringe andre egenskaper til matproduktet. Proteinhydrolysatet som inkorporeres i matproduktet kan derfor f.eks. være basert på fisk eller fiskeavfall, eller kjøtt eller kjøttavfall, utledet fra ben ved å utsette knust ben for fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen. Andre proteinaktige biprodukter fra fiskeindustrien kan også anvendes ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for å danne proteinhydrolysater ifølge oppfinnelsen som et proteinsupplement eller for å tilveiebringe andre egenskaper til matproduktet.
- Et ytterligere aspekt ved den foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for å fremstille et matprodukt omfattende trinnene: oppnåelse av et proteinhydrolysat ifølge oppfinnelsen og fremstilling av et matprodukt ved anvendelse av hydrolysatet. Matprodukter egnet fremstilt med fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen inkluderer alle de ovenfor nevnte matprodukter.

- I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille et smakspreparat, hvori fremgangsmåten omfatter trinnene: fremstilling av en vandig velling omfattende 1-100 vekt% av proteininnholdende materiale, slik som f.eks. 25-100 vekt% proteininnholdende materiale, avhengig av materialets vanninnhold og struktur; inkubering av vellingen med et proteolytisk preparat utledet fra en *Gadidae*-art; agitering av vellingen i 0,25-48 timer, slik som i området fra 1-10 timer, fortrinnsvis 1,5-6 timer, ved en temperatur i området fra 2 til 40°C; eventuelt inaktivering av den proteolytiske blandingen; separering av løsningsfraksjonen fra fast materiale; og konsentrering av løsningen til et tørrvektsinnhold på fra 10 vekt% til 98 vekt%.

Det eventuelle inaktiveringstrinnet utføres passende som beskrevet ovenfor. Tilsvarende kan agiteringstrinnet og konsentreringstrinnet utføres ved hjelp av en hvilken som helst fremgangsmåte slik som de beskrevet ovenfor.

- I en foretrukket utførelsesform er temperaturen gjennom den proteolytiske inkuberingen i området fra 5-30°C, slik som i området fra 10-20°C eller i området fra 10-30°C, inkludert 15°C til 25°C. Inkuberingen kan utføres ved en hvilken som helst pH hvorved det proteolytiske preparatet som anvendes er aktivt. I en utførelsesform er pH gjennom inkuberingen i området fra 6-11, fortrinnsvis fra 6 til 9.

- I en anvendelig utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for fremstilling av et sjømatmakspreparat, hvori det proteininnholdende materialet utledes fra sjømat eller biprodukter av sjømat slik som materialer utledet fra fiskearter inkludert torsk, kolje, sei, kveite, flyndre, ål, breiflabb, laks, ørret og havabbor, sild, lodde og andre sjømatarter inkludert sjøpinnsvin, reker, hummer, kreps, krabber, musling, østers og blåskjell.

- I en ytterligere utførelsesform er fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen for fremstilling av et kjøttmakspreparat, hvori det proteininnholdende materialet utledes fra kjøtt eller biprodukter av kjøtt. I fordelaktige utførelsesformer er det proteininnholdende materialet utledet fra én eller flere arter fra oksekjøtt, lam, svin, reinsdyr og fjærkrearter, inkludert kylling, kalkun, and og struts.

I enda et ytterligere aspekt tilveiebringer oppfinnelsen et ikke-mat-produkt omfattende et proteinhydrolysat ifølge oppfinnelsen. Smaksegenskapene oppnådd ved hjelp av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen er fordelaktig for fremstilling av fôrprodukter og kjæledyrfôr.

- Dannelsen av svært hydrolyserte proteinhydrolysater fra fiskegelatin kan videre forbedre gelatinprodukter for inkorporering i kosmetikk, slik som kremer og sjampoer.

Anvendelsen av proteinhydrolysatet ifølge oppfinnelsen som fermenteringsmedium som nevnt ovenfor gjør videre også hydrolysatet ifølge oppfinnelsen anvendelig for

andre fermenteringer, slik som for fermentering av buljong spesielt i det medisinske området for fremstilling av farmasøytiske midler.

I enda et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å frigjøre i det minste en del av astaxantinet fra et astaxantininnholdende skalldyrmateriale
 5 hvori fremgangsmåten omfatter trinnene: fremstilling som et utgangsmateriale en vandig velling som beskrevet omfattende skalldyrmaterialet; inkubering av velling med et proteolytisk preparat utledet fra en *Gadidae*-art slik som beskrevet ovenfor, agitering av vellingen ved en temperatur i området fra 2-60°C; og inaktivering av den proteolytiske blandingen for å oppnå et proteinhydrolysat inneholdende i
 10 forhold til utgangsmaterialet et høyere innhold av frigjort astaxantin.

Som et ytterligere eventuelt trinn omfatter fremgangsmåten separeringen av en astaxantininnholdende vandig fase ved hjelp av egnede midler slik som sedimentering, filtrering eller sentrifugering.

De følgende eksempler illustrerer videre den foreliggende oppfinnelse og de er ikke
 15 ment på noen måte å begrense rammen av oppfinnelsen som krevet.

EKSEMPEL 1: Fremstilling av en blanding av proteaser fra torsk

Omtrent 100 kg frossen torskeinnmat uten lever, milt og fiskemelke ble tint og drikkevann ble tilsatt til et fire gangers volum i en ekstraksjonstank og pH ble justert til pH 8-9 med en natriumhydroksidløsning. Blanding ble rørt i 2-6 timer
 20 ved 0-5°C. Etter en kort periode med råsedimentering (omtrent 30 min.) ble det vandige ekstraktet rent av den gjenværende uløselige innmaten med en pumpe og samlet i en sedimenteringstank. Det vandige ekstraktet fikk stå i den avkjølte sedimenteringstanken for å sedimentere i 24-60 timer. Supernatanten ble dekantert fra supernatanttanken til en oppbevaringstank ved anvendelse av en pumpe.
 25 Supernatanten ble konsentrert 10-20 ganger ved hjelp av ultrafiltrering og diafiltrering til et akseptabelt ionestyrkenivå med ledningsevne under omtrent 3 ms/cm. 10-15 liter ultrafiltrert og diafiltrert proteasepreparat ble oppnådd og blir henviset til som kryotin. Proteasepreparatet hadde en proteolytisk aktivitet på omtrent 1,5 BAPNA enheter/ml. Repeterte fremstillinger ved anvendelse av den
 30 beskrevne fremgangsmåte ga seriepreparater med en aktivitet mellom 1-5 BAPNA enheter/ml.

Aktiviteten ble målt med en analyse som anvender det syntetiske substratet bensyl-Arg-p-nitroanilid (BAPNA) ved en sluttsubstratkonsentrasjon på 1 mM i 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8,1 ved 25°C. Absorbanseøkningen måles ved 405 nm
 35 og BAPNA-aktiviteten beregnes i henhold til en molar absorptivitetskonstant på 8800 M⁻¹cm⁻¹.

EKSEMPEL 2: Rensing av torskeelastase og torskeserinkollagenase fra konsentrert torskeinnmatsekstrakt

Omtrent 10-15 liter ultrafiltrert og diafiltrert konsentrat som oppnådd i eksempel 1

ble satt på et par 1 l pakkede kromatografikolonner tilkoblet i en serie, hvor den første inneholdt et CM-hurtiggjennomstrømningskationbytteresein (Pharmacia, Sverige), og den andre en DEAE-hurtiggjennomstrømnings anionbytteresein (Pharmacia, Sverige). Kolonnene ble pre-ekvilibrert med omtrent 10 kolonnevolum 25 mM Tris-buffer med pH 7,8 inneholdende 2,5 mM kalsiumklorid (buffer A). Konsentratet ble pumpet på kolonnene ved en gjennomstrømningshastighet på omtrent 100 ml/min. Når påføringen av den konsentrerte løsningen på kolonnene var fullstendig ble restmaterialet vasket av det kontinuerlige kolonnesystemet med omtrent 8 l buffer A. Gjennomstrømningsfraksjonen som inneholdt trypsin, chymotrypsin og eksopeptidaser ble samlet og kalt Cryotin X.

Etter at denne vaskingen var fullstendig, ble kolonnene individuelt eluert med omtrent 5 kolonnevolumer med en høysaltløsning av 25 mM Tris-buffer, pH 7,8 inneholdende 0,5 M NaCl og 2,5 mM kalsiumklorid. Torskeelastase ble på den måten avgitt fra CM-kolonnen og serinkollagenasen fra DEAE-kolonnen.

15 EKSEMPEL 3: Hydrolyse og frigjøring av protein og proteinaktig materiale fra rekeskall ved anvendelse av Cryotin

Rekeskall og vann ble blandet sammen i et forhold på omtrent 1:0,75 (vekt/vekt) ved å tilsette 3000 g rekeskall til 2250 g vann. En prøve på 130 ml Cryotin enzymblanding fra eksempel 1 inneholdende 1,4 U/ml (BAPNA enheter), dvs. totalt 182 enheter pr. 3000 g rekeskall, eller omtrent 0,06 BAPNA hydrolyserende enheter pr. g rekeskall. Denne blandingen ble omsatt ved å røre den i en roterende trommel i 5 timer ved en hastighet på 40 sykluser/min. ved romtemperatur (omtrent 20°C). Løsningsfraksjonen ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom en grov-sikt etterfulgt av osteklutfiltrering. I løpet av det 5 timers reaksjonsforløpet ble prøvene tatt fra reaksjonsblandingen for monitorering av reaksjonen. For sammenligningsformål ble reaksjonen gjentatt med det samme materialet bortsett fra at 130 ml vann ble tilsatt istedenfor Cryotinenzymblandingen og prøver ble tatt for målinger.

Ved en analyse av løselige aminosyrer og peptider, ved anvendelse av TCA (trikloreddiksyre)-presipitering etterfulgt av omsetting med Folin Ciocalteus' reagens ble det fastslått at Cryotinreaksjonen dannet mer enn en seks gangers mengde løselige aminosyrer og peptider i løpet a 5 timer sammenlignet med prøven uten Cryotin. Den Cryotininneholdende serien dannet videre løselige aminosyrer og peptider tilnærmet lineært med tid gjennom den 5 timer lange reaksjonsperioden, mens den Cryotinfrie serien frigjorde et utbrudd av løselige aminosyrer og peptider kun i den første timen av reaksjonen, hvilket indikerer frigjøringen av allerede løselige aminosyrer og peptider men ingen hydrolyse av protein.

En analyse av astaxantin, ved anvendelse av absorbansmålinger ved 468 nm ble anvendt for å monitorere frigjøringen fra rekeskall. Disse målingene viste en mer enn 2,5 gangers frigjøring av pigmentet med den enzymatiske Cryotin-

fremgangsmåten enn fremgangsmåten uten Cryotin som sannsynlig frigjør pigment primært med mekaniske skjærekrefter.

EKSEMPEL 4: Sammenligning av hydrolyse og løselighet av protein og proteinaktig materiale fra rekeskall ved anvendelse av Cryotin og Alcalase 2,4 l

- 5 Rekeskall og vann ble blandet sammen i et forhold på 1:0,75 (vekt/vekt), ved å tilsette 6000 g rekeskall til 4500 g vann. En prøve på 266 ml Cryotinenzympreparat ifølge eksempel 1 inneholdende 110 U/ml (Azocoll units), dvs. totalt 29247 Azocoll enheter pr. 6000 g rekeskall, eller omtrent 4,87 Azocoll-hydrolyserende enheter pr. g rekeskall. Blandingen ble omsatt ved røring i en roterende trommel i 5 timer ved en hastighet på 40 sykluser pr. min. ved romtemperatur (omtrent 20°C). Løsningsfraksjonen ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom en grov-sikt etterfulgt av osteklutfiltrering. Gjennom det 5 timers lange reaksjonsforløpet ble prøver tatt fra reaksjonsblandingen for monitorering av reaksjonen.
 - 15 For sammenligningsformål ble reaksjonen repetert med de samme materialer bortsett fra at rekeskall-vannblandingen ble omsatt med alkalase 2,4 l. Rekeskall og vann ble blandet sammen i forhold 1:0,75 (vekt/vekt) ved å tilsette 2500 g rekeskall til 1875 g vann. En prøve på 0,25 ml alkalase 2,4 l enzymblanding inneholdende 46794,6 U/ml (Azocoll enheter), dvs. totalt 11699 Azocoll-enheter pr. 2500 g rekeskall eller omtrent 4,68 Azocoll-hydrolyserende enheter pr. g rekeskall. Blandingen ble omsatt ved røring i en roterende trommel i 5 timer ved en hastighet på 40 sykluser pr. min. ved romtemperatur (omtrent 20°C). Løsningsfraksjonen ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom en grov-sikt etterfulgt av ostekutfiltrering. I løpet av det 5 timer lange reaksjonsforløpet ble prøver tatt fra reaksjonsblandingen for monitorering av reaksjonen.
 - 25 Azocoll-analysen ble anvendt for å måle sammenlignbar aktivitet av Alcalase og Cryotin fra eksempel 1 ettersom Alcalase er kjent for å ha en svært lav aktivitet mot BAPNA eller GPR. Aktiviteten ble målt på den følgende måte: 50 mg Azocoll-prøver ble målt i små glassrør, to prøver Asocoll pr. konsentrasjon av enzymprøven som skulle analyseres. Fosfatbuffer (100 mM, pH 8,0) ble tilsatt til hvert rør til et sluttvolum på 5 ml. Enzymprøver som skulle analyseres ble tilsatt til rørene etter at rørene var oppbevart med kun buffer og Asocoll i 5-10 min. Etter tilsetning av enzymprøver til analyseblandingen ble systemet tillatt inkubert ved romtemperatur i 15 min. hvoretter absorbansen ved 520 nm ble målt. Resultatene ble først observert som et lineært forhold mellom absorbansen ved 520 nm mot mengden enzym
 - 30
 - 35
 - 40
- Med en analyse for løselige aminosyrer og peptider ved anvendelse av TCA (trikloreddiksyre)-presipitering etterfulgt av omsetting med Folin Ciocalteus

- reagens ble de fastslått at Cryotin-reaksjonen dannet med en 8 ganger større mengde løselige aminosyrer og peptider på 4 timer sammenlignet med prøven med alkalase. En analyse av astaxantin ved anvendelse av absorbansemålinger ved 468 nm ble anvendt for å monitorere astaxantinfrigjøringen fra rekeskall. Disse målingene viste
- 5 mer enn en 1,6 gangers frigjøring av pigmentet med den enzymatiske kryotinfremgangsmåten sammenlignet med alkalasereaksjonen.

EKSEMPEL 5: Fremstilling av matmakstilsetningsstoffer fra rekeskall ved anvendelse av Cryotin

- Rekeskall (omtrent 20 % tørrstoff) og vann ble blandet sammen i et forhold på
- 10 1:0,63 (vekt/vekt) ved å tilsette 3980 g rekeskall til 2525 g vann. En 165 ml prøve Cryotin-enzymblanding fra eksempel 1 inneholdende 1,4 U/ml (BAPNA-enheter), dvs. totalt 231 enheter pr. 3980 g rekeskall, eller omtrent 0,058 BAPNA-hydrolyserende enheter pr. g rekeskall. Denne blandingen ble omsatt ved røring i en rotasjonstrommel i 4 timer ved en hastighet på 40 sykluser pr. min. ved en
- 15 temperatur på omtrent 15°C. Løsningsfraksjonen ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom en grov-sikt etterfulgt av osteklutfiltrering. Den faste resten ble anvendt for chitinproduksjon. Den vandige fraksjonen ble varmet til 70°C i 10 min. for å inaktivere enzymene og pasteurisere væsken. Den vandige fasen ble deretter konsentrert til 30 % tørrstoffinnhold ved hjelp av fordamping ved
- 20 45°C under vakuum.

EKSEMPEL 6: Hydrolyse og frigjøring av proteinaktig materiale som får fra rekeskall ved anvendelse av Cryotin

- Rekeskall og vann ble blandet sammen i et forhold på 1:0,5 (vekt/vekt) ved å tilsette 3000 g rekeskall til 1500 g vann. En prøve på 130 ml Cryotin enzyymblanding fra
- 25 eksempel 1 inneholdende 1,4 U/ml (BAPNA-enheter), dvs. totalt 182 enheter pr. 3000 g rekeskall, eller omtrent 0,06 BAPNA-hydrolyserende enheter pr. g rekeskall. Denne blandingen ble omsatt ved hjelp av røring i en roterende trommel i 10 timer ved en hastighet på 40 sykluser pr. min. ved en temperatur på omtrent 30°C. Den løselige fraksjonen ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom
- 30 en grov-sikt etterfulgt av osteklutfiltrering. Den faste resten ble anvendt for chitinproduksjon. Den vandige fraksjonen ble oppvarmet til 70°C i 10 min. for å inaktivere enzymene og pasteurisere væsken. Den vandige fasen ble deretter konsentrert til 40 % tørrstoffinnhold ved hjelp av fordamping ved 45°C under vakuum hvor etter konsentratet ble dehydrert ytterligere i en tørker.

35 EKSEMPEL 7: Et smakspreparat fra hele reker

- Hele frosne reker (22,2 % tørrstoff) ble malt i en kvern. De malte rekene og vann ble blandet sammen med et forhold på 1:0,75 (vekt/vekt), ved å tilsette 6700 g malte reker til 5010 g vann. En prøve på 311 ml Cryotin-enzympreparat fra eksempel 1 inneholdende 1,4 U/ml (BAPNA-enheter), dvs. totalt 435,4 enheter til 6700 g malte
- 40 hele reker, eller omtrent 0,065 BAPNA hydrolyserende enheter pr. g malte hele reker. Denne blandingen ble omsatt ved røring i en roterende trommel i 4 timer med

en hastighet på 40 sykluser pr. min. ved en temperatur på 17°C. Løsningsfraksjonen ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom en grov-sikt etterfulgt av osteklutfiltrering og sedimentering i 10-20 min. Den faste resten ble anvendt for chitinproduksjon. Den vandige fraksjonen ble varmet til 70°C i 10 min. for å inaktivere enzymene og pasteurisere væsken. Den vandige fasen ble deretter konsentrert til 30-40 % tørrstoffinnhold ved hjelp av fordamping ved 45°C under vakuum. Eksperimentet ble repetert med det samme forholdet av råmaterialer, vann og enzympreparat bortsett fra at inkuberingstemperaturen ble holdt ved 20°C og fordampingstørkingen ble utført ved 50°C, hvilket resulterte i et produkt med vesentlig samme kvalitet.

EKSEMPEL 8: Et smakspreparat fra hummer

Hummerhoder og klør eller hele hummere ble anvendt i denne fremstillingen og råmaterialet var enten frosset eller ferskt. Frosne hele hummere ble malt i en kvern. Den malte hummeren og vann ble blandet sammen i et forhold på 1:0,75 (vekt/vekt) ved tilsetning av 8540 g malt hummer til 6410 g vann. Blandingen av hummer og vann ble bragt til 90°C i en kort periode (for å inaktivere spesielt fenyloksidase som er tilstede i hummeren) og deretter avkjølt til fremgangsmåtetemperatur som i dette eksemplet var 35°C. En prøve av 385 ml Cryotin-blanding fra eksempel 1 inneholdende 1,4 U/ml (BAPNA-enheter), dvs. totalt 539 enheter til 8540 g malt hele hummer eller omtrent 0,063 BAPNA hydrolyserende enheter pr. g malt hel hummer. Denne blandingen ble omsatt ved røring i en roterende trommel i 1,5 timer ved en hastighet på 40 sykluser pr. min. ved en temperatur på omtrent 35°C. Løsningsekstraktet ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom en grov-sikt etterfulgt av osteklutfiltrering og sedimentering i 10-20 min. Den faste resten ble anvendt for chitinframstilling. Den vandige fraksjonen ble varmet til 70°C i 10 min. for å inaktivere enzymene og pasteurisere væsken. Den vandige fasen ble deretter konsentrert til 40-50 % tørrstoffinnhold ved hjelp av fordamping ved 45°C under vakuum.

Påfølgende eksperimenter ble utført med det samme forholdet av råmateriale, vann og enzympreparat bortsett fra at ferooppvarmingstemperaturen var 70°C og inkuberingstemperaturen ble holdt ved 30°C, hvilket resulterte i et produkt med vesentlig lik kvalitet. Det samme resultatet ble oppnådd med det endelige konsentreringstrinnet utført ved 50°C for å oppnå et produkt med 30-40 % tørrstoffinnhold.

35 EKSEMPEL 9: Smakspreparat fra lyr

Som råmateriale er det mulig å anvende enten lyrkjøtt, dvs. skinnfileter av lyr eller lyrbein og råmaterialet kan enten være ferskt eller frossent. Ferske skinnfileter fra lyr ble malt i en kvern. De malte lyrfiletene og vann ble blandet sammen ved å tilsette 4-50 g malte lyrfileter med et tørrvektinnhold på 21 % til 4685 g vann. En prøve av 292 ml Cryotin-blanding fra eksempel 1 inneholdende 1,4 U/ml (BAPNA-enheter), dvs. totalt 409 enheter til 4750 g malte lyrfileter eller omtrent 0,086

BAPNA-hydrolyserende enheter pr. g malte lyrfileter. Denne blandingen ble omsatt ved røring i en roterende trommel i 4 timer ved en hastighet på 40 sykluser pr. min. ved en temperatur på omtrent 26°C. Ekstraksjonsfraksjonsløsningen ble separert fra den faste resten ved hjelp av filtrering gjennom en grov-sikt etterfulgt av filtrering gjennom en osteklut. Den vandige fraksjonen ble varmet til 70°C i 10 min. for å inaktivere enzymene og pasteurisere væsken. Den vandige fasen ble deretter konsentrert til 25-35 % tørrvektinnhold ved hjelp av fordamping ved 45°C under vakuum.

Eksperimentet ble repetert med det samme forholdet av råmaterialer, vann og enzympreparat bortsett fra at inkuberingstemperaturen ble holdt ved 30°C og fordampingsstørkingen ble utført for å oppnå et produkt med 18-25 % tørrvekt, hvilket resulterte i et produkt med i det vesentlige tilsvarende kvalitet.

EKSEMPEL 10: Fremstilling av rekesuppe ved anvendelse av smakspreparater fra hele reker

Den følgende suppeoppskriften er et eksempel på anvendelsen av matsmaksstoffekstraktene for humant forbruk. Ved tilbereding av en suppe kan ekstraktet enten anvendes som basismateriale som i den følgende oppskrift eller som toppmateriale som tilsettes i en liten mengde til en nesten ferdig suppe for å gi den en endelig smak.

Rekesuppe for 12 personer

Ingredienser:

2 løk

2 gulrøtter

2,5 l vann (eller fiskekraft)

2 spiseskjeer fiskebuljong

1 spiseskje karripulver

250 g rekeekstrakt fra eksempel 7

1 fedd hvitløk, hakket

100 g smør, smeltet + 100 g mel

200 ml fløte

100 ml hvitvin

Løkene og gulrøttene hakkes og surres i en sausepanne. 2,5 l vann (eller fiskekraft) tilsettes til sausepannen sammen med 2 spiseskjeer fiskebuljong, 1 spiseskje karri, 250 g rekeekstrakt fra eksempel 7 og 1 hakket fedd hvitløk. Ingrediensene blandes sammen og småkokes i 20 min. og deretter filtreres suppekraften fra. Suppekraften jevnnes med en blanding av 100 g smeltet smør og 100 g mel tilsatt til det smeltede smøret. Fløten røres inn i suppen og suppen gjenoppvarmes. Deretter tilsettes hvitvinen og hele reker for dekorering. Suppen er klar for servering.

EKSEMPEL 11: Fjerning av membran fra blekksprut ved anvendelse av et proteolytisk preparat fra torsk

To stykker frossen hel blekksprut, omtrent 300 g hver ble plassert i en roterende trommel sammen med 450 ml vann og omtrent 300 ml torskeutledet proteolytisk preparat fremstilt som i eksempel 1 hvor pH var blitt justert til 8,2. Det proteolytiske preparatet hadde en aktivitet på omtrent 105 GPR enheter/ml, slik at den totale proteolytiske aktiviteten var omtrent 31400 GPA enheter eller omtrent 52 GPR enheter/g blekksprut (1,7 BAPNA-enheter/g). pH ble justert til 8,0 flere ganger i løpet av inkuberingen. Temperaturen ble holdt ved 10°C eller under og blekkspruten ble undersøkt og prøver ble tatt etter 15, 30, 60, 150, 210 og 330 min.

Aktiviteten ble målt i en analyse ved anvendelse av det syntetiske substratet Gly-L-Pro-L-Arg-p-nitroanilid (GPR eller sGPRpna) ved en substratkonsentrasjon på 0,3 mM i 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂, pH 8,1 ved 25°C. Absorbanseøkningen ble målt ved 410 nm og GPR-aktiviteten ble beregnet i henhold til en molar absorptivitetskonstant på 8800 M⁻¹cm⁻¹. GPR-enheter ble omdannet til BAPNA-enheter i henhold til ligningen $U_{BAPNA} = U_{GPR}/31$.

Den følgende tabell angir observasjonene og målingene utført gjennom eksperimentforløpet.

Tabell 11.1

Tid, min.	Temp., °C	pH	A ₂₈₀	Kommentarer
0	2	8,1	0,105	Frosne blekksprut-biter.
15	2	6,9	0,270	Løsgjøring av membran observert, ett stykke ble slimete på overflaten, pH justert m/NaOH.
30	3	7,8	0,368	Uendret fra siste inspeksjon, pH justert m/NaOH.
60	4	7,6	0,510	Membrannedbrytning begynte. Blærer fulle av væske oppstod på overflaten. Membranen mer slimete. pH justert m/NaOH.
150	8	7,4	0,527	Membranen har løsere form, pH justert m/NaOH.
210	10	7,6	0,580	Mørk del av membranen har nesten forsvunnet fra kroppen, fortsatt tilstede på halen. pH justert.
330	10	-	0,690	Membranen har nesten forsvunnet fra kroppen og halen.

Det ble observert at et proteolytisk preparat effektivt fjerner proteinaktig hud og membran fra vevet det er festet på slik som membranen på overflaten av blekksprut. Et tilsvarende forsøk ble utført for nedbrytning av membransekken på fiskemelke fra torsk.

5

EKSEMPEL 12: Fremstilling av hydrolysater fra lammekjøtt

107 g stekt malt lammekjøtt ble blandet med 163 ml vann. Temperaturen på vellingen var omtrent 25°C. 7 ml Cryotin med en aktivitet på omtrent 1,4 BAPNA enheter/ml ble blandet med vellingen (dvs. omtrent 0,09 U/g kjøtt) og pH ble justert til 7,3 ved tilsetning av NaOH. Vellingen ble rørt i 4 timer ved 20°C og prøver ble fjernet ved 1 times intervaller for analysering (pH-målinger og absorbanser ved 280 nm). Etter at den 4 timer lange inkuberingen var ferdig hadde hydrolysatet en karakteristisk smak og aroma som for lammekjøtt. Tabell 12.1 viser absorbansemålinger for prøvene, hvilket indikerer frigjøringen av løselige peptider og aminosyrer.

15

Tabell 12.1

Tid, timer	pH	A ₂₈₀
0	7,32	0,014
1	6,98	0,083
2	6,86	0,102
3	6,85	0,130
4	6,85	0,146

Forsøket ble repetert med rått malt lammekjøtt og tilsvarende resultater ble oppnådd.

20

EKSEMPEL 13: Sensorisk testing av reke- og hummerhydrolysater

En prøve av rekesmaksstoffspreparat ifølge eksempel 7 ble utsatt for en sensorisk testing av et testpanel bestående av seks paneldeltakere. Før testing ble preparatet fortynnet ved tilsetning av 20 g smakspreparat til 200 ml vann og varmet til omtrent 50°C. Prøven ble servert i små plastkopper. Paneldeltakerne evaluerte først prøven individuelt ved å bedømme aroma, farge og smak og notere beskrivende trekk og deretter diskutere de generelle sensoriske karakteristika for testprøven.

25

Tabell 13.1 Liste av kommentarer utført av de individuelle paneldeltakere
Tabell 13.1

Farge	Aroma	Smak
rosa (laks)	søt, svak aroma, koljelukt.	søt smak, rekekjøtt, kolje fiskekjøtt

- 5 Panelet nådde deretter den følgende samlede konklusjon: rekesmakspreparatet hadde en svært karakteristisk smak og lukt av reke, spesielt en smak av rekekjøtt (også smak av fiskekjøtt).

EKSEMPEL 14: Hydrolyse av proteininnholdende materiale med et foredlet proteolytisk preparat uten elastase og serinproteaser

- 10 Alle forsøkene i eksemplene 3-13 repeteres bortsett fra at det torskeutledede proteolytiske preparatet fra eksempel 2 (kalt Cryotin X) ble anvendt som det hydrolyserende middel. Vesentlig de samme forhold av proteolytisk aktivitet, målt som i eksempel 1 ble anvendt for å oppnå tilsvarende resultater som de beskrevet i eksemplene 3-13.

- 15 Fig. 1: Stabiliteten til det torskeutledede proteolytiske preparatet fra eksempel 1 ble målt som en funksjon av temperatur og tid ved å observere gjenværende enzymatisk aktivitet etter 24 timers inkubering ved pH-verdier på 6, 8 og 10 og temperaturer på 10°C, 30°C og 45°C. Av denne figuren kan man observere at det proteolytiske preparatet har tilsvarende stabile karakteristika ved de tre pH-verdiene men er mye
20 mer stabil ved lave temperaturer enn høye. Enzymaktivitet ble monitorert ved absorbansemålinger ved 247 nm ved å anvende tosyl arginin metylester (TAME). Aktiviteten ble bestemt ved 25°C ved anvendelse av TAME ved en endelig konsentrasjon på 0,075 mM og hvor analysebufferen bestod av 40 mM Tris/HCl pH 8,1 og 10 mM CaCl₂. En aktivitetseenhet ble beregnet ved 1 µmol hydrolysert
25 substrat/min. ved anvendelse av en molar ekstinksjonskoeffisient på 540 M⁻¹cm⁻¹ ved 247 nm.

- Fig. 2: Aktiviteten til det torskeutledede proteolytiske preparatet fra eksempel 1 ble vist som en funksjon av pH ved anvendelse av TAME som et substrat. Bufferne som ble anvendt ved en sluttkonsentrasjon på 0,1 M var hepes/HCl (pH 5,4-8,0) og
30 glysinat (pH 8,3-10,8) inneholdende 10 mM kalsiumklorid. Fra denne figuren kan man observere at preparatet har relativt god TAME-hydrolyserende aktivitet gjennom pH-området mellom 7 og 10,8 med et maksimum mellom pH 8 og 10,5, hvor aktiviteten ble bestemt som beskrevet i teksten til fig. 1.

- Fig. 3: Temperaturavhengigheten av aktiviteten til det torskeutledede proteolytiske preparatet i eksempel 1. Den enzymatiske aktiviteten ble monitorert ved anvendelse
35

- av tosyl arginin metylester (TAME) som substrat ved en sluttkonsentrasjon på 0,75 mM. Analysebufferne bestod av 40 mM Tris/HCl (pH 8,1) og 10 mM kalsiumklorid og aktiviteten ble monitorert ved å følge absorbansen ved 247 nm. Fra denne figuren kan man observere preparatets økende hydrolyttiske aktivitet opp til et maksimum på omtrent 50°C, hvorefter aktiviteten synker raskt som følge av temperaturdenaturering. (Aktivitet bestemt som i teksten til fig. 1).
- 5

PATENTKRAV

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et proteinhydrolysat fra et naturlig proteininnholdende råmateriale,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter trinnene:
 - 5 a) fremstilling av en vandig velling omfattende 1-100 % våtvekt av proteininnholdende materiale,
 - b) inkubering av vellingen med et proteolytisk preparat utledet fra en *Gadidae*-art,
 - 10 c) agitering av vellingen i 0,25-48 timer ved en temperatur i området fra 0 til 60°C,
 - d) eventuell inaktivering av den proteolytiske blandingen, og
 - e) eventuell separering av løsningsfraksjonen fra fast materiale.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet utledes fra fisk valgt fra
 - 15 gruppen bestående av torsk, kolje og lyr.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet utledes fra torsk.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet tilveiebringes ved en
 - 20 fremgangsmåte omfattende trinnene:
 - i) blanding av vann med fiskeinnvoller
 - ii) agitering av blandingen en periode på 0,5 timer eller lenger
 - iii) separering av faste rester fra løsning
 - iv) konsentrering av den vandige løsningen for å oppnå det proteolytiske
 - 25 preparat
5. Fremgangsmåte ifølge krav 4,
karakterisert ved at agiteringen utføres ved en temperatur i området fra 0 til 10°C, og at pH er i et område fra 6 til 9.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet omfatter i det minste et
 - 30 enzym valgt fra gruppen bestående av trypsin, chymotrypsin, elastase, kollagenase, aminopeptidase og en type karboksypeptidaseenzym.
7. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet har en proteolytisk
 - 35 aktivitet i området fra 0,1 til 50 BAPNA enheter/ml, målt ved absorbansøkningen ved 405 nm.
8. Fremgangsmåte ifølge krav 6,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet har en proteolytisk aktivitet i området fra 0,5 til 10 BAPNA enheter/ml.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at vellingen inkuberes med det proteolytiske preparatet ved en mengde på 10-1000 BAPNA proteolytiske enheter/kg proteininnholdende råmateriale, foretrukket 25-250 BAPNA proteolytiske enheter/kg.
- 5 10. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet ytterligere foredles ved fjerning av i det minste ett av dets enzymkomponenter.
11. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at i det minste et ikke-fisk utledet enzympreparat
10 tilsettes til det fiskeutledede proteolytiske preparatet.
12. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at den vandige vellingen behandles med i det minste et enzympreparat forut for eller etter behandlingen med det fiskeutledede proteolytiske preparatet.
- 15 13. Fremgangsmåte ifølge krav 11 eller 12,
karakterisert ved at i det minste ett enzympreparat er et lipasepreparat.
14. Fremgangsmåte ifølge krav 11 eller 12,
karakterisert ved at i det minste ett enzympreparat omfatter ett eller flere enzymkomponenter valgt fra gruppen bestående av amylase, glykanase,
20 glutaminase, fytase, glykosidase, cellulase, chitinase og pektinase.
15. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at trinn c) utføres ved en temperatur i området fra 2 til 40°C.
16. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
25 karakterisert ved at trinn c) utføres ved en temperatur i området fra 5 til 30°C.
17. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at trinn c) utføres ved en pH på mellom 6 til 11, fortrinnsvis mellom 6 til 9.
- 30 18. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteininnholdende materialet er et dyreprotein valgt fra gruppen bestående av fiskeprotein, skalldyrprotein, melkeprotein, myseprotein, kasein, kjøttprotein, blodprotein, eggprotein, elastin og gelatin.
19. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
35 karakterisert ved at det proteininnholdende materialet er et vegetabilsk protein valgt fra gruppen bestående av soyaprotein; kornprotein f.eks. hvetegluten eller zein; rapsfrøprotein; alfalfaprotein, erteprotein, bønnelignende bønneprotein; bomullsfrøprotein og sesamfrøprotein.

20. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
karakterisert ved at det proteininnholdende materialet er fra en marin organisme.
- 5 21. Fremgangsmåte ifølge krav 20,
karakterisert ved at materialet fra den marine organismen er valgt fra gruppen bestående av hel fisk, fiskekjøtt, fiskeavfall, fiskeinnvoller, fiskeskinn, fiskebein og enhver del eller blanding derav.
- 10 22. Fremgangsmåte ifølge krav 20,
karakterisert ved at det proteininnholdende materialet er et materiale inkludert hele dyr, kjøtt, skall eller enhver del eller blanding eller kombinasjoner derav utledet fra en marin organisme valgt fra gruppen bestående av kreps- eller bløtdyr.
- 15 23. Fremgangsmåte ifølge krav 22,
karakterisert ved at krepse- eller bløtdyret velges fra gruppen bestående av reker, hummer, kreps, krabber, muslinger, østers og blåskjell.
24. Fremgangsmåte ifølge krav 18,
karakterisert ved at det proteininnholdende råmaterialet omfatter proteinaktige membraner eller skinn, slik som fra fisk, fiskelever, svømmeblærer fra fisk, indre kroppshulrom fra fisk, fiskeegg eller fiskemelke.
- 20 25. Fremgangsmåte ifølge krav 18,
karakterisert ved at det proteininnholdende råmaterialet velges fra gruppen bestående av lam, svin, oksekjøtt, kylling og kalkun.
- 25 26. Fremgangsmåte ifølge krav 25,
karakterisert ved at det proteininnholdende materialet er rått eller kokt og omfatter muskelvev, sener eller annet bindevev, ben, avfall eller enhver del eller blanding derav.
27. Fremgangsmåte ifølge hvilket som helst av kravene 1-27,
karakterisert ved at det proteininnholdende materialet hydrolyseres under fermenteringsbetingelser for å oppnå et fermentert proteinhydrolysat.
- 30 28. Fremgangsmåte ifølge hvilke som helst av kravene 1-26,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter et ytterligere trinn hvor proteinhydrolysatet utsettes for en fermenteringsprosess.
29. Proteinhydrolysat,
karakterisert ved å være oppnådd ved hjelp av fremgangsmåten ifølge
35 hvilke som helst av de foregående krav.
30. Proteinhydrolysat ifølge krav 29,
karakterisert ved at det hydrolyserte proteinet er utledet fra et dyreprotein valgt fra gruppen bestående av fiskeprotein, skalldyrprotein,

melkeprotein, myseprotein, kasein, kjøttprotein, blodprotein, eggprotein, elastin og gelatin.

31. Proteinhydrolysat ifølge krav 29,
 5 k a r a k t e r i s e r t v e d at det hydrolyserte proteinet er utledet fra et vegetabilsk protein valgt fra gruppen bestående av soyaprotein; kornprotein slik som hvetegluten eller zein; rapsfrøprotein; alfalfaprotein, erteprotein, bønneaktig bønneprotein; bomullsfrøprotein; og sesamfrøprotein.
- 10 32. Matprodukt,
 k a r a k t e r i s e r t v e d å omfatte et proteinhydrolysat ifølge et hvilket som helst av kravene 29-31.
33. Matprodukt ifølge krav 32,
 15 k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et smakspreparat for anvendelse i et produkt valgt fra gruppen bestående av en suppe, en saus, en buljong, en paté, en mousse, en soufflé, en ost, stekemel, eller "orly"-mel og bakevarer.
34. Fremgangsmåte for fremstilling av et matprodukt,
 20 k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter trinnene (i) oppnåelsen av et proteinhydrolysat ifølge hvilket som helst av kravene 29-32 og (ii) formulering av et matprodukt ved anvendelse av hydrolysatet.
35. Fremgangsmåte for fremstilling av et smakspreparat,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten omfatter trinnene:
 25 a) fremstilling av en vandig velling omfattende 1-100 % våtvekt proteininnholdende materiale,
 b) inkubering av vellingen med et proteolytisk preparat utledet fra en *Gadidae*-art,
 c) agitering av vellingen i 0,25-48 timer ved en temperatur i området fra 2 til
 30 40°C,
 d) eventuelt inaktivering av den proteolytiske blandingen,
 e) separering av den løselige fraksjonen fra fast materiale,
 f) konsentrering av løsningen til et tørrvektinnhold på fra 10 vekt% til 98 vekt%.
- 35 36. Fremgangsmåte ifølge krav 35,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at smakspreparatet er et sjømatssmakspreparat og det proteininnholdende materialet er utledet fra sjømat eller sjømatbiprodukter.
37. Fremgangsmåte ifølge krav 35,
 k a r a k t e r i s e r t v e d at smakspreparatet er et kjøttssmakspreparat og at det
 40 proteininnholdende materialet er utledet fra kjøtt eller kjøttbiprodukter.

38. Fremgangsmåte ifølge krav 35,
karakterisert ved at inkuberingen i trinn c) utføres ved en temperatur i området på 5 til 30°C.
- 5 39. Fremgangsmåte ifølge krav 35,
karakterisert ved at inkuberingen i trinn c) utføres ved en pH i området fra 6 til 9.
40. Fremgangsmåte ifølge krav 35,
karakterisert ved at det proteolytiske preparatet oppnås ved hjelp av fremgangsmåten i henhold til krav 4.
- 10 41. Fremgangsmåte ifølge krav 36,
karakterisert ved at det proteininnholdende materialet er utledet fra én eller flere arter valgt fra gruppen bestående av torsk, kolje, sei, kveite, flyndre, ål, breiflabb, laks, ørret, havabbor, sild, lodde, sjøpinnsvin, reke, hummer, kreps, krabbe, muslinger, østers, og blåskjell.
- 15 42. Fremgangsmåte ifølge krav 37,
karakterisert ved at det proteininnholdende materialet er utledet fra én eller flere arter valgt fra gruppen bestående av okse, lam, svin, reinsdyr og fjærfearter inkludert kylling, kalkun, and og struts.
- 20 43. Et ikke-matprodukt
karakterisert ved å omfatte et proteinhydrolysat ifølge hvilke som helst av kravene 29-31.
- 25 44. Et ikke-matprodukt ifølge krav 43,
karakterisert ved at det er et produkt valgt fra gruppen bestående av fôrprodukt, kjæledyrfôr, kosmetikk, fermenteringsbuljong og et farmasøytisk produkt.
- 30 45. Fremgangsmåte for å frigjøre i det minste en del av astaxantinet fra et astaxantininnholdende skalldyrmateriale,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter trinnene: fremstilling som et utgangsmateriale en vandig velling omfattende skalldyrmateriale; inkubering av vellingen med et proteolytisk preparat utledet fra en *Gadidae*-art, agitering av vellingen ved en temperatur i området fra 2-60°C; og inaktivere den proteolytiske blandingen for å oppnå et proteinhydrolysat inneholdende i forhold til
35 utgangsmaterialet et høyere innhold av frigjort astaxantin.
46. Fremgangsmåte ifølge krav 45,
karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter et ytterligere trinn for separering av en astaxantininnholdende vandig fase.

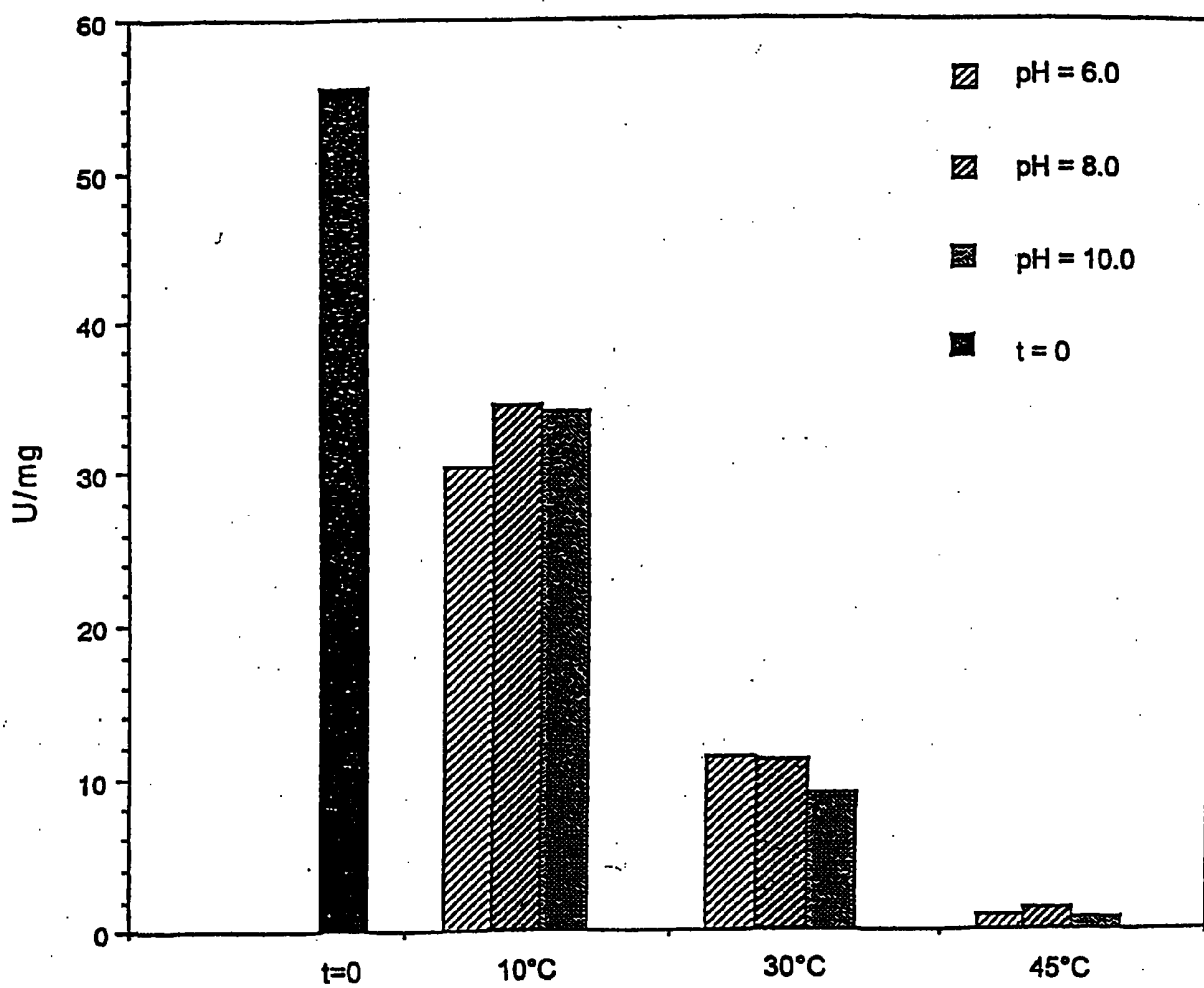


Fig. 1

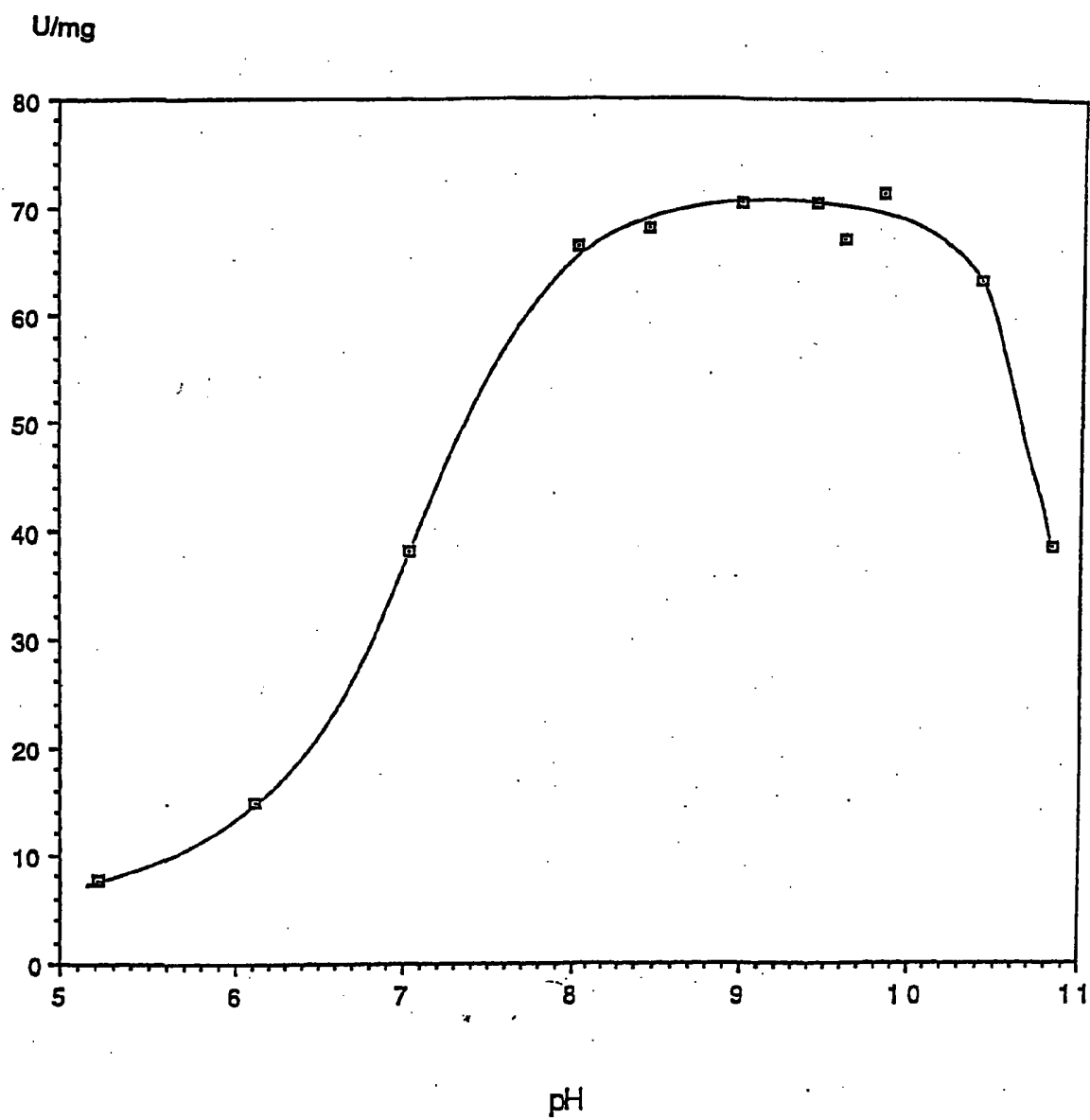


Fig. 2

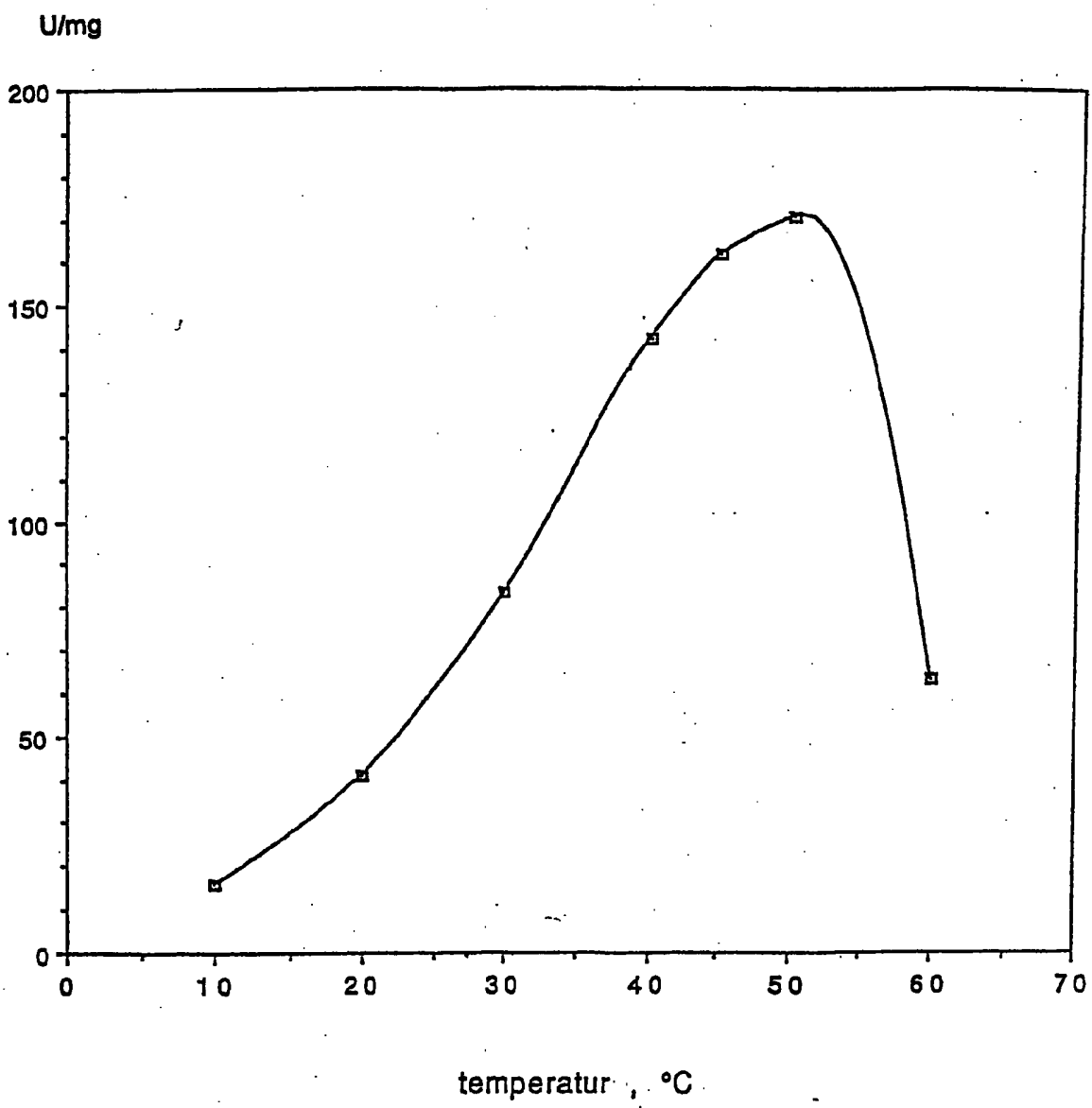


Fig. 3