



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **262 675 A1**

4(51) **C 12 P 21/06**
A 23 J 3/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 P / 305 477 0

(22) 29.07.87

(44) 07.12.88

(71) VEB Berlin-Chemie, Glienicker Weg 125, Berlin, 1199, DD

(72) Schuster, Werner, Dipl.-Chem.; Friedrich, Manfred, Doz. Dr. sc.; Brüggmann, Frank, Dipl.-Ök., DD

(54) Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten für Diätnahrungen

(55) Enzymatische Hydrolyse, Proteine, Pankreatin, Thermitase

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten für Diätnahrungen durch enzymatische Hydrolyse von Proteinen, die alle zur Ernährung notwendigen, insbesondere essentielle Aminosäuren enthalten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß als Enzym zur Hydrolyse ein Komplex aus 10 g bis 40 g Pankreatin und 35000 bis 60000 TE Thermitase, einer Protease aus *Thermoactinomyces vulgaris*, je kg Protein eingesetzt wird. Als Proteine werden vor allem Milchsäurekasein und/oder fettarmes Fleisch von Säugetieren eingesetzt.

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten für Diätnahrungen durch enzymatische Hydrolyse von Proteinen, die alle notwendigen, insbesondere essentielle Aminosäuren enthalten, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Enzym ein Komplex aus 10 bis 40g Pankreatin und 35000 bis 60000 TE Thermitase, einer Prothease aus *Thermoactinomyces vulgaris*, je kg Protein eingesetzt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Enzym ein Komplex von 15 bis 30g Pankreatin und 45000 bis 55000 TE Thermitase je kg Protein eingesetzt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Enzym ein Komplex von 20g Pankreatin und 50000 TE Thermitase je kg Protein eingesetzt wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Proteinhydrolysaten, die im wesentlichen aus niedermolekularen Peptiden bestehen und frei von hochmolekularen Anteilen sind.

Das Anwendungsgebiet dieser Proteinhydrolysate erstreckt sich vorwiegend auf Elementardiäten und Sondennahrungen für Patienten mit Verdauungsstörungen, z. B. Maldigestion, Malabsorption, entzündlichen Magen-, Pankreas- oder Darmerkrankungen, pre- und postoperative Zustände des Gastro-Intestinaltraktes sowie für Frühgeborene und Säuglinge.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Bei der Beurteilung der bekannten Verfahren zur Gewinnung von Proteinhydrolysaten ist das vorgesehene Anwendungsgebiet zu berücksichtigen.

Es sind verschiedene ballaststoffarme oder -freie, bilanzierte, orale Diäten bekannt, die aus ernährungsphysiologischen Gründen abgebautes Protein enthalten. Ziel dieser Ernährungsform ist eine vollständige Absorption der aufgenommenen Nahrung, wozu eine verminderte oder nicht mehr notwendige enzymatische Verdauungsleistung beiträgt. In der Mehrzahl der Fälle werden hierfür Protein-Totalhydrolysate eingesetzt, wobei zur Hydrolyse Salz- oder Schwefelsäure verwendet wird. Sofern sie nur freie Aminosäuren und keine Peptide enthalten, können sie auch für die parenterale Ernährung eingesetzt werden.

Für die meisten Indikationen ist es jedoch nicht erforderlich, Protein-Totalhydrolysate oder Aminosäuremischungen zur Deckung des Aminosäurebedarfs einzusetzen.

Es wurden eine Reihe von Vorschlägen unterbreitet, GB-PS 1338936, DD-AP 118519, DD-AP 120791, DE-OS 2521814, US 3969540, DE-OS 2621000, die alle die Herstellung von enzymatischen Proteinhydrolysaten beschreiben, die aber wegen erheblicher Nachteile, wie Unverträglichkeit, schlechter Geschmack oder technologischer Schwierigkeiten bei der Herstellung (lange Hydrolysezeiten) nicht oder nur unter starken Vorbehalten zur Anwendung gekommen sind. Auch der Vorschlag des DD-WP 154190, eine enzymatische Hydrolyse von Kasein und anderen vorgereinigten Proteinen mit der Endopeptidase „Thermitase“ durchzuführen, führte nicht zum Erfolg, da die erhaltenen Peptidmischungen stark geschmackswirksame Begleitstoffe enthielten.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, in einer vereinfachten Verfahrensweise ohne zusätzliche Reinigungsoperationen ein Proteinhydrolysat herzustellen, das frei von höhermolekularen Peptidanteilen und für eine Verwendung in Elementardiäten und Sondennahrungen geeignet ist und sich durch äußerst vorteilhafte sensorische und organoleptische Eigenschaften auszeichnet.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, Verfahrensbedingungen aufzuzeigen, bei denen als Reaktionsprodukt unter Vermeidung eines nachträglichen Zusatzes essentieller Aminosäuren eine hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung ernährungsphysiologisch vollwertige Mischung niedermolekularer Peptide entsteht. Aufwendige Reinigungsoperationen sollen wegfallen.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren wird ein reines Protein für die Hydrolyse herangezogen, das frei von unerwünschten, löslichen Bestandteilen ist und alle notwendigen, insbesondere essentielle Aminosäuren enthält. Als Protein kommt vorzugsweise Kasein in Betracht, das in der Milchindustrie rein anfällt.

Ebenfalls geeignet sind auch andere vorgereinigte Proteine oder Proteinmischungen, die den genannten Kriterien entsprechen, z. B. Leguminosenproteinisolate oder tierische Proteine wie Muskelgewebe u. ä.

Die enzymatische Proteinhydrolyse wird bis zum vollständigen Abbau der Proteine zu niedermolekularen Peptiden durchgeführt. Erfindungsgemäß wurde völlig überraschend gefunden, daß die Aufgabenstellung gelöst werden kann, wenn zur Hydrolyse der eingesetzten Proteine ein Komplex von 10 bis 40g Pankreatin und 35000 bis 60000 TE Thermitase als Enzym pro kg Protein eingesetzt wird.

Durch die komplexe Anwendung von Pankreatin und Thermitase in einem Schritt, werden die eingesetzten Proteine vom Pankreatin in kurz- und mittelkettige Peptide gespalten und somit der Hydrolyse durch die hoch unspezifische Thermitase zugänglicher gemacht. Das Enzymgemisch spaltet Protein in ein Gemisch aus Di- und Tripeptiden sowie geringen Anteilen freier Aminosäuren, ohne daß höhermolekulare Peptide auftreten.

Erfindungsgemäß wird eine 2–15%ige Proteinlösung, vorzugsweise 10%ige Lösung eines alle notwendigen, insbesondere essentiellen Aminosäuren enthaltenden Proteins mit Natronlauge auf pH 6,0–8,5, vorzugsweise pH 8 eingestellt und auf 50–60°C erwärmt. Zur Hydrolyse werden je kg Protein 10 bis 40 g Pankreatin und 35 000–60 000 TE Thermitase (1 TE — Aktivität, die in 1 min bei 55°C und Kasein als Substrat 1 mol Tyrosin freisetzt) zugesetzt und unter den genannten Bedingungen 4 bis 10 h, vorzugsweise 7 bis 8 h, hydrolysiert.

Zur besseren Ausnutzung der enzymatischen Wirksamkeit ist es zweckmäßig, während der Hydrolyse den pH-Wert durch Zugabe von Natronlauge konstant zu halten.

Zur Verhinderung des Anstiegs der Keimzellen läßt sich gegebenenfalls ein geeignetes Bakteriostatikum (z. B. 0,1–0,3% Toluol oder Chloroform) zusetzen, das bei der Aufarbeitung des Präparates wieder entfernt wird.

Nach Erreichen des maximalen Hydrolysegrades wird zur Inaktivierung des Enzymkomplexes für etwa 5 min auf 95–100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen der Raumtemperatur wird — gegebenenfalls nach Einengen im Vakuum — filtriert oder separiert und sprüh- oder gefriergetrocknet. Man erhält ein weißes, sehr gut schmeckendes, leicht lösliches Pulver, das in seiner Aminosäurezusammensetzung derjenigen des Ausgangsproteins entspricht. Der Hydrolysegrad des Präparates liegt bei 35–45% (mit TNBS über die freien NH₂-Gruppen bestimmt). Die mittlere Peptidkettenlänge beträgt damit 2,2–2,8.

Das Ergebnis war völlig überraschend, da die Verwendung der einzelnen Enzyme allein bei der Hydrolyse niemals eine so gute organoleptische Produktqualität erbrachte.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

5 kg Milchsäurekasein werden in 50 l Wasser suspendiert und mit 5 N Natronlauge auf pH 8,0 eingestellt. Hierzu sind 850 ml erforderlich. Die Lösung wird auf 55°C erhitzt und zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums mit 100 ml Chloroform versetzt. Danach werden 100 g handelsübliches Pankreatin und 250 000 TE Thermitase gelöst in 1 l Wasser zugegeben und zur Hydrolyse des Proteins 8 h bei 55°C gerührt. Während der Hydrolyse ist der pH-Wert zu kontrollieren und mit 5 N Natronlauge auf pH 8,0 nachzustellen. Die pH-Kontrolle hat in der ersten Stunde der Hydrolyse kontinuierlich und danach in 30 min Intervallen zu erfolgen.

Nach Ablauf der Hydrolysezeit wird zur Inaktivierung des Enzymkomplexes auf 95–100°C erhitzt und etwa 5 min bei dieser Temperatur gehalten. Die Hydrolyselösung wird danach auf Raumtemperatur abgekühlt und klar filtriert. Das Filtrat wird sprühgetrocknet. Das so gewonnene Präparat ist ein nahezu geschmacks- und geruchloses weißes Pulver mit folgenden Kennzahlen:

Ausbeute 4,7 kg; Peptidgehalt (N · 6,37) 84,7%; Hydrolysegrad 41,4%; mittlere Kettenlänge der Peptide 2,4.

Beispiel 2

1 kg Muskelgewebe (fettarmes Rind- oder Pferdefleisch) wird in einem Fleischwolf zerkleinert, mit 10 l Wasser vermengt und mit 5 N Natronlauge auf pH 8,0 eingestellt. Dafür werden 80 ml benötigt. Die Lösung wird auf 55°C erhitzt und zur Vermeidung mikrobiellen Wachstums mit 25 ml Chloroform versetzt. Danach werden 20 g Pankreatin und 50 000 TE Thermitase gelöst in 200 ml Wasser zugegeben und zur Hydrolyse des Proteins 8 h bei 55°C gerührt. Der pH-Wert ist analog Beispiel 1 zu kontrollieren und nachzustellen. Nach Ablauf der Hydrolysezeit wird für 5 min auf 95–100°C erhitzt zur Inaktivierung des Enzymkomplexes. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die an der Oberfläche abgesetzte Fettschicht durchstoßen und die Hydrolyselösung abgezogen und klar filtriert. Das Filtrat wird sprühgetrocknet.

Das so gewonnene Präparat ist ein nahezu geschmacks- und geruchloses weißes Pulver mit folgenden Kennzahlen:

Ausbeute 0,87 kg; Peptidgehalt 81,5%; Hydrolysegrad 39,2%; mittlere Kettenlänge der Peptide 2,55.