



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110213971 A

(43)申请公布日 2019.09.06

(21)申请号 201780084783.8

(22)申请日 2017.12.20

(30)优先权数据

727786 2016.12.20 NZ

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.07.26

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/NZ2017/050167 2017.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/117868 EN 2018.06.28

(71)申请人 三福有限公司

地址 新西兰奥克兰

(72)发明人 田宏(塞布丽娜)

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

代理人 陈万青 姚开丽

(51)Int.Cl.

A23L 33/18(2006.01)

C12P 21/06(2006.01)

C12P 7/64(2006.01)

A61K 35/00(2006.01)

A61K 35/612(2006.01)

A61K 35/616(2006.01)

A61K 35/618(2006.01)

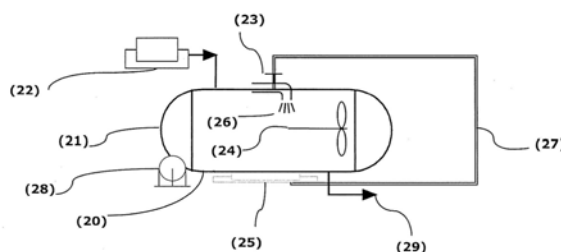
权利要求书3页 说明书32页 附图11页

(54)发明名称

加工贝类的方法和所得的组合物

(57)摘要

本发明涉及加工整个新鲜贝类,包括整个鲜活双壳类动物如贻贝的方法,并且涉及所得的液体和干燥形式的组合物,这些组合物包含高产率的具有改善生物利用率的生物活性组分。该方法包括至少一个酶处理步骤:将包含一种或多种酶的酶制剂施加于该整个新鲜贝类,并使该贝类与该酶制剂接触,直到肉和其他生物材料基本上与该贝类的壳或外骨骼分离,以及通过在相同的酶处理步骤中使用相同的酶制剂和/或通过在相同或一个或多个随后的酶处理步骤中施加不同的酶制剂来液化该肉和其他生物材料。在优选的方法中,该贝类起始材料在施加该酶制剂时或直到施加之前是活的,并且该方法在施加该酶制剂之前不使用任何机械方法来减小该贝类的尺寸。



1. 一种由整个新鲜贝类起始材料制备液体组合物的方法,其中该方法包括至少一个酶处理步骤,该至少一个酶处理步骤包括:

(a) 将包含一种或多种酶的酶制剂施加于该整个新鲜贝类,以及

(b) 使该贝类与所述酶制剂接触,直到肉和其他目标底物(如本文所定义)基本上与该贝类的壳或外骨骼分离,以及

(c) 通过在相同的酶处理步骤中使用相同的酶制剂和/或通过相同或一个或多个随后的酶处理步骤中施加不同的酶制剂来液化该肉和其他目标底物。

2. 如权利要求1所述的方法,其中在将该酶制剂施加于该贝类时或直到施加之前,该贝类是整个鲜活贝类。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(a)中的该酶制剂包含至少一种蛋白水解酶。

4. 如权利要求3所述的方法,其中如果在步骤(c)中使用的话,该不同的酶制剂包含一种或多种经选择以作用于非蛋白目标底物的酶。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该方法在该酶处理步骤之前不使用任何机械方法来减小该贝类起始材料的尺寸。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括至少一个从所得液体组合物中移除任何固体材料和/或非目标底物的分离或过滤步骤。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该酶处理步骤的持续时间短于90分钟。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该酶处理步骤的持续时间在15-40分钟之间。

9. 如权利要求6所述的方法,其中对该所得液体组合物进行一个或多个进一步的过滤步骤,以实现粒度小于200 μm 的所得液体组合物。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该酶制剂包含一种或多种适合作用于选自包含肌原纤维蛋白、碳水化合物、胶原蛋白和/或脂质的组的一种或多种目标底物的酶。

11. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中基于在该或每个酶处理步骤中待处理的该或每种目标底物的估计量而计算,该酶制剂中包含的该或每种酶的量在0.1%-10%的范围内。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该贝类是双壳类动物物种。

13. 如权利要求12所述的方法,其中该方法进一步包括在该酶处理步骤之前或期间进行的裂开或打开步骤,以便将该双壳类动物的壳的内部的至少一部分内部暴露于该酶制剂。

14. 如权利要求13所述的方法,其中该裂开或打开步骤是非机械过程。

15. 如权利要求13所述的方法,其中该裂开或打开步骤包括加温步骤。

16. 如权利要求15所述的方法,其中该加温步骤通过短时间施加蒸汽即快速蒸汽喷射或注入而进行。

17. 如权利要求13所述的方法,其中这些双壳类动物在该裂开或打开步骤时或直到其之前是活的。

18. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该方法在约20 $^{\circ}\text{C}$ -60 $^{\circ}\text{C}$ 的最佳加工温度下进行。

19. 如权利要求12所述的方法,其中这些目标底物之一是展肌,并且该酶制剂中的至少一种酶适合作用于该目标底物以便于打开这些壳。

20. 如权利要求19所述的方法,其中该或每种酶选自包含以下项的组:衍生自产生枯草杆菌蛋白酶的细菌菌株的酶、淀粉酶和胰蛋白酶,这些细菌菌株包括解淀粉芽孢杆菌。

21. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该酶制剂包含至少一种经选择以作用于胶原蛋白底物的酶。

22. 如权利要求21所述的方法,其中该或这些酶选自包含衍生自地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉的酶的组。

23. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该酶制剂包含至少一种选自包含半胱氨酸蛋白酶的组的酶。

24. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该酶制剂包含至少一种经选择以作用于脂质底物的酶。

25. 如权利要求24所述的方法,其中该或这些酶选自包含米曲霉、糖酶、蔗糖酶、淀粉酶、磷酸酶、蛋白酶、酯酶和过氧化氢酶的组。

26. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该酶制剂包含至少两种选自包含以下项的组的酶的组合:衍生自解淀粉芽孢杆菌的酶、衍生自地衣芽孢杆菌的酶、半胱氨酸蛋白酶和衍生自米曲霉的酶。

27. 如权利要求1或12所述的方法,其中这些酶处理步骤和该打开或裂开步骤在单个封闭的处理容器或室中进行。

28. 如权利要求27所述的方法,其中该处理容器或室可以密封和加压。

29. 如权利要求27或28所述的方法,其中该处理容器或室水平地定向或以倾斜位置定向,而不是垂直定向。

30. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中在加工过程中不添加水。

31. 如权利要求27-30中任一项所述的方法,其中该处理容器或室包括可密封的开口、加热构件、用于酶制剂的定量给料系统、和搅拌构件。

32. 如权利要求31所述的方法,其中该定量给料系统是包括连接到位于该容器或室内的定量给料构件的分配装置的自动系统。

33. 如权利要求31所述的方法,其中该搅拌构件包括能够以多个角度或位置连续或半连续地旋转或搅拌该处理室的构件。

34. 如权利要求28所述的方法,其中该处理室包括排放系统,以在该或每个酶处理步骤之后排出该处理室内的热量或蒸汽和压力。

35. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中连续进行两个或更多个酶处理步骤以逐渐处理该贝类起始材料中存在的基本上全范围的目标底物。

36. 如权利要求6-35中任一项所述的方法,其中该方法包括再循环步骤,其中将在该或这些分离和/或过滤步骤之后剩余的材料用一个或多个进一步的酶处理步骤再处理。

37. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中对该所得液体组合物进行酶失活步骤或稳定化步骤。

38. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中将该所得液体组合物干燥。

39. 如权利要求39所述的方法,其中该干燥步骤通过低温干燥方式如冷冻干燥或通过

快速干燥方式如喷雾干燥、流化床干燥、真空干燥或带式干燥进行。

40. 如权利要求38或49所述的方法,其中将该干燥组合物研磨或碾磨成粉末。

41. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括一个或多个分级分离和/或提取步骤,以将该所得组合物分离成脂质或富含脂质的级分以及亲水或含水级分。

42. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中将该所得组合物或者该或这些级分进一步加工成食品、营养品、药品、兽医产品或化妆品。

43. 一种液体贝类组合物,通过如权利要求1-37中任一项所述的方法产生。

44. 一种干燥贝类组合物,通过如权利要求38-42中任一项所述的方法产生。

45. 一种冷冻干燥的贝类组合物,通过如权利要求6所述的方法然后是冷冻干燥步骤而产生。

46. 一种脂质或富含脂质的贝类提取物,通过回收通过如权利要求41所述的方法产生的该脂质或富含脂质的级分而产生。

47. 一种亲水性贝类提取物,通过回收通过如权利要求41所述的方法产生的该亲水或含水级分而产生。

48. 一种食品,包含如权利要求43-47中任一项所述的液体或干燥贝类组合物或提取物。

49. 一种营养品或药品,包含如权利要求43-47中任一项所述的液体或干燥贝类组合物或提取物。

50. 一种兽医产品,包含如权利要求43-47中任一项所述的液体或干燥贝类组合物或提取物。

51. 一种化妆品,包含如权利要求43-47中任一项所述的液体或干燥贝类组合物或提取物。

加工贝类的方法和所得的组合物

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及加工贝类的方法,该贝类包括软体动物、甲壳类动物和棘皮动物,并且涉及由此得到的组合物。本发明尤其但不仅仅涉及对双壳纲软体动物的加工。

背景技术

[0002] 贝类长期以来一直是人类群体饮食的一部分。大多数熟悉的食用贝类物种(如蛤蜊、贻贝、鸟蛤、牡蛎、三角斧蛤(pipi)和扇贝)属于一群被称为双壳类动物的软体动物。术语双壳类动物是指具有两个铰接的壳(在技术上称为瓣)的软体动物,这两个铰接的壳通过柔性韧带沿着铰接线连接在一起。其他熟悉的食用贝类物种包括甲壳类动物如小虾、对虾、新西兰小龙虾(scampi)、螃蟹、龙虾和小龙虾、棘皮动物如海胆,以及其他软体动物物种如鲍贝(abalone)或鲍鱼(paua)。

[0003] 已对贝类和其他食用海洋物种的提取物的健康益处和生物活性性质进行了广泛的研究(Sularia等人,(2015) Marine-Based Nutraceuticals: An Innovative Trend in the Food and Supplement Industries [基于海洋的营养物:食品 and 补充剂行业的创新趋势] Mar. Drugs [海洋药物] (2015) 13, 6336-6351)。例如,已经对新西兰青口贝(新西兰绿唇贻贝(*Perna canaliculus*))的独特性质研究了40多年。据观察,新西兰沿海毛利人群体在历史上的关节炎发病率低于内陆毛利人群体。这归因于沿海毛利人群体对青口贝的高消耗,从而表明青口贝物种具有抗炎活性。临床试验已表明,新西兰绿唇贻贝的脂质提取物确实具有抗炎活性,并且可用于治疗关节炎(Halpern (2000) Anti-inflammatory effects of a stabilized lipid extract of *Perna canaliculus* (Lyprinol) [新西兰绿唇贻贝的稳定化脂质提取物(利筋诺)的抗炎作用]; B00r020ien等人(2008) Systematic review of the nutritional supplement *Perna Canaliculus* (green-lipped mussel) in the treatment of osteoarthritis [营养补充剂新西兰绿唇贻贝(青口贝)在治疗骨关节炎中的系统性综述] Q J Med [医学杂志季刊] 2008; 101: 167-179)。各种类型的青口贝脂质提取物已经商业化用于缓解关节炎症状。

[0004] 新西兰青口贝(新西兰绿唇贻贝)还含有高水平的 ω -3脂肪酸,并且它们是所有其他有益生物活性组分的丰富来源,这些组分包括维生素、矿物质、牛磺酸、氨基酸、多酚、类胡萝卜素,以及葡糖胺聚糖(GAG或粘多糖)、胶原和糖原的活性化合物,其中一些已被证明具有积极的健康作用(Grienke等人(2014) Bioactive compounds from marine mussels and their effects on human health [海洋贻贝的生物活性化合物及其对人类健康的影响] Food Chemistry [食品化学] 142 (2014) 48-60; Coulson等人 and Rainsford等人(2015) Novel Natural Products: Therapeutic Effects in Pain, Arthritis and Gastro-intestinal Diseases [新型天然产品:在疼痛、关节炎和胃肠疾病中的治疗效果], Progress in Drug Research [药物研究进展] 70)。

[0005] 每年人类消耗超过1000万吨甲壳类动物。这些要么是被捕捞的要么是由渔场生产的,大多数是小虾和对虾物种。常消耗的其他物种包括螃蟹、龙虾、小龙虾和新西兰小龙虾。

磷虾和桡足动物没有被广泛捕捞,但可能是地球上生物量最大的动物,并且构成了食物链的重要部分。棘皮动物如新西兰海胆 (*Evechinus chloroticus*),更被广泛称为基那(kina)(一种新西兰特有的海胆)自前欧洲时代以来一直是毛利人饮食的传统组成部分,并且自1986年以来在新西兰进行了少量商业捕捞。这些海洋物种也可能含有具有潜在健康益处的有益生物活性组分。

[0006] 从贝类中提取有益生物活性组分是非常有挑战性的,因为以保持肉和其他生物材料中存在的生物活性组分的性质和量的方式打开壳或外骨骼以从壳或外骨骼内移除或分离肉和其他生物材料可能是困难的。从壳或外骨骼内移除材料的常规加工方法典型地涉及贝类的机械加工,例如手工或机械去壳、压碎或研磨以打开或打破壳或外骨骼以便接近内部材料。

[0007] 对于双壳类动物,这些方法中的一些涉及初始高温烫漂过程以在去壳之前打开壳。然而,使用高温并不理想,因为高温会减少、改变、损害、变性或破坏壳内材料中的有益生物活性组分。最近,已经开发出高压法(HPP)来打开壳,并且如果指定的话,该方法可以在较低温度下操作。这典型地是昂贵的分批加工操作,商业规模单元的最低成本达数十万美元。HPP过程仅打开壳,之后仍然需要将肉从壳中移除或分离,然后进一步加工。因此,需要多个加工步骤和设备与HPP过程结合使用。

[0008] 因此,打开壳或打破外骨骼并接近贝类内部材料的最常见商业加工方法是手工方法或机械压碎方法,这些方法不需要使用热(从而避免对生物活性组分的热损害)。手工过程是劳动强度大、昂贵且耗时的,因此使商业生产效率低下。手工或机械方法通常导致低产率,因为并非所有的生物材料都从壳或外骨骼中移除,其中一些遗留下来并作为废弃物丢弃。而且,所得的产物往往具有不同的生物活性组分,并且可能具有较低水平的某些生物活性,因为一些组分在加工过程中丢失或改变和/或可溶性组分可能与加工液一起排出。

[0009] 此外,大多数贝类物种(包括双壳类动物如贻贝)的消化道包含触发生物自溶过程的内源性酶。在通过例如均质化(例如压碎和研磨)对贝类进行机械加工期间,这些内源性酶被释放并引起生物材料的降解,继而引起化合物和分子结构的变化,从而导致生物活性组分和功能性质的丧失。贝类即使在冷藏或冷冻下储存时以及在死后储存期间,也会发生这种情况。这是通过常规加工技术生产的组合物或提取物在结构和任何生物活性方面不一致的原因之一。

[0010] 为了从壳或外骨骼内的肉生产组合物或提取物,一旦提取出肉,就必须进行尺寸减小过程,以便将肉减小成粒状,使得它可以被进一步加工成各种形式,如粉末或油。通常使用机械尺寸减小技术,包括将肉均质化、共混、研磨、切碎、碾磨、粉碎或离心,然后通常是低温干燥,例如冷冻干燥。有时将肉冷冻干燥,然后接受机械尺寸减小技术处理,再进行提取过程。

[0011] 与机械打开和尺寸减小技术相关的缺点有很多。首先,由于设备成本和加工的额外能量成本,生产成本可能很高,并且加工可能花费很长的时间。其次,由于许多加工步骤和生物材料从一件设备到另一件设备的转移,生物材料经常在该过程中暴露于空气,这将导致氧化、变质和污染,从而产生质量差的最终产品。第三,由于生物材料未完全分解以释放其功能组分,这些方法通常产生溶解性差的提取物,这限制了进一步加工的选择(例如,一些干燥方法不可行)并且限制了提取物在某些应用如液体食品应用中的使用。第四,由于

生物材料可能在各种加工步骤中损失,例如当材料在设备之间转移时,和/或加工方法不能充分利用或分解原料而产生大比例的浪费,因此这些方法通常产生低定量产率。第五,一些方法产生具有非常低水平的生物活性的产物,因为一些生物活性组分要么被改变(例如,在如上所述的自溶中被降解),要么在加工过程中损失,或者加工方法不能完全分解或释放生物活性组分。例如,一些方法涉及在机械尺寸减小之前或期间烹煮壳或外骨骼内的肉,这可能导致液体和潜在的生物活性组分的损失,以及对一些生物活性组分的热损害及随后在所得产物中的生物活性性质的丧失。

[0012] 在其他方法中,例如美国专利4,801,453中所述的方法,将肉从贻贝的壳中手工移除,然后放入研磨机中并粉碎成约3/4英寸的小块,然后冷冻干燥并压碎成细粉。向提取物中添加有机酸或碱金属或碱土金属盐以稳定其活性。该方法需要许多步骤和不同的设备,从壳内手工移除肉是非常耗时且劳动强度大的。在加工过程中添加抗氧化剂在这些类型的加工方法中变得必不可少,以便在缓慢的过程中保持所得贻贝提取物的生物活性。

[0013] 酶水解方法已被用于生产贝类组合物,包括贻贝提取物,但是这些方法要么对已经呈干燥或粉末形式的贻贝材料进行,因此如上所述,材料的质量已经受到损害,要么这些方法对已经以手工或机械方式从壳中移除并且在任何酶处理步骤前均质化或粉碎的死后贻贝肉(通常是冷冻和解冻的)进行。在一些方法中,不从壳或外骨骼中移除肉,而是将死亡的整个贝类压碎,然后将所有压碎的材料进行酶水解。在所有这些现有技术方法中,原始(以前鲜活的)贝类起始材料已经明显改变,最初是因贝类的死亡(通过包括自溶在内的死后生物过程导致生物材料的改变),然后是因加工步骤如冷冻、加热、均质化、压碎、干燥,它们均会导致贝类中生物材料和生物活性组分的改变,包括因自溶、变性、降解和氧化。这些步骤可能消除、破坏或改变原始鲜活贝类材料中存在的某些类别的化合物,从而显著影响最终产品的生物活性性质和生物利用率。此外,现有技术酶处理过程的持续时间很长,通常需要最少三个小时的水解,从而引起生物活性组分的进一步降解和氧化。在这些过程中添加抗氧化剂是必需的,以保持所得贻贝提取物的生物活性。

[0014] 现有的贝类提取物(包括全贻贝粉和脂质提取物)由于其结构和疏水性而通常难以溶于含水介质(包括消化道)。因此,当以口服方式或通过需要跨膜吸收的其他途径给予时,它们存在相当大的配制挑战并且经常遭受不良的或不规则的生物利用率。

[0015] 发明目的

[0016] 本发明的一个目的是提供一种改进的加工贝类的方法,该方法改善已知技术的一些缺点和局限,或者至少为公众提供有用的选择。本发明的进一步目的是提供通过本发明的方法生产的贝类组合物和/或提取物的提高的定量和/或定性产率,或者至少为公众提供有用的选择。本发明的进一步目的是提供改进的贝类组合物和/或提取物,或者至少为公众提供有用的选择。

[0017] 本说明书中引用的所有参考文献(包括任何专利或专利申请)均特此通过援引而并入。不承认任何参考文献构成现有技术。对参考文献的讨论陈述其作者的主张,申请人保留质疑所引用的文献的准确性和针对性的权利。将清楚地理解,尽管本文提及了许多现有技术出版物,但该参考文献并不构成承认任何这些文献在新西兰或任何其他国家形成本领域公知常识的一部分。

[0018] 众所周知,在不同的司法管辖区,术语“包括”的属性可以是排他性或包含性的含

义。出于本说明书的目的,且除非另有说明,否则术语“包括”应具有包含性含义,即,它将被视为不仅包括其直接引用的所列组成部分,还包括其他未指定的组成部分或要素。当关于方法或过程中的一个或多个步骤使用术语“包括”时,也将使用该基本原理。

[0019] 根据仅作为实例给出的随后的描述,本发明的进一步方面和优点将变得显而易见。

发明内容

[0020] 根据本发明的一个方面,提供了一种由整个新鲜贝类起始材料制备液体组合物的方法,其中该方法包括至少一个酶处理步骤,该至少一个酶处理步骤包括:

[0021] (a) 将包含一种或多种酶的酶制剂施加于该整个新鲜贝类,以及

[0022] (b) 使该贝类与所述酶制剂接触,直到肉和其他目标底物(如本文所定义)基本上与该贝类的壳或外骨骼分离,以及

[0023] (c) 通过在相同的酶处理步骤中使用相同的酶制剂和/或通过相同或一个或多个随后的酶处理步骤中施加不同的酶制剂来液化该肉和其他目标底物。

[0024] 优选地,步骤(a)中的酶制剂包含至少一种蛋白水解酶。

[0025] 本发明的方法在酶处理步骤之前不使用任何机械方法来减小贝类起始材料的尺寸。

[0026] 优选地,贝类起始材料是在将酶制剂施加于贝类时或直到施加之前的整个鲜活贝类。

[0027] 优选地,该方法进一步包括至少一个分离步骤,以从所得的液体组合物中移除任何固体材料和/或非目标底物。

[0028] 优选地,该或每种酶制剂包含一种或多种适于作用于贝类起始材料的一种或多种目标底物的酶。

[0029] 目标底物可以包括存在于贝类的壳或外骨骼之上或之中的任何生物材料,包括壳或外骨骼内的肉(meat或flesh)、存在于壳或外骨骼上的壳聚糖、可能存在于壳或外骨骼内的生物材料层(例如,贻贝中存在的珍珠层、棱柱层和角质层(类似皮肤))、韧带、展肌、牙、足丝(或须)、肠和足。

[0030] 优选地,所得的液体组合物是稳定的乳液状组合物,该组合物具有至少一个疏水相和至少一个亲水相。优选地,该组合物包含微粒和/或微滴和/或纳米颗粒和/或纳米液滴的混合物。优选地,疏水相中的至少一些液滴或小球具有围绕或包封这些液滴或小球的层,其中一种或多种脂质或亲脂性生物活性组分位于这些液滴或小球内并受到保护。优选地,亲水相包含分散或悬浮在其中的一种或多种生物活性组分。

[0031] 优选地,鲜活贝类选自以下物种:新西兰青口贝(*Perna canaliculus*)、亚洲绿贻贝(*Perna viridis*)、地中海蓝贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、紫贻贝(*Mytilus edulus*)、加州贻贝(*Mytilus californianus*)、褐贻贝(*Perna perna*)、其他股贻贝属(*Perna*)贻贝物种、韩国贻贝(*Mytilus coruscus*)、智利贻贝(*Mytilus chilensis*)、海湾贻贝(*Mytilus trossulus*)、罗纹贻贝(*Geukensia demissa*)、枣贻贝(*Lithophaga lithophaga*)和淡水斑纹贻贝(*Dreissena polymorpha*);*Brachidontes rodriguezii*; *Perumytilus purpuratus*; *Aulacomya ater*;合唱壳菜蛤(*Choromytilus chorus*);以及偏

顶蛤属 (*Modiolus*) 贻贝物种; 蛤蜊的所有种; 鸟蛤的所有种; 牡蛎的所有种, 包括岩牡蛎 (*Saccostrea glomerata*)、布拉夫牡蛎 (*Ostrea chilensis*) 和太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*); 三角斧蛤的所有种 (*Phaphies* 属种), 包括双带蛤蜊 (*toheroa*) 和双壳贝 (*tuatua*); 扇贝的所有种, 包括金湾扇贝 (*Pecten novaezelandiae*)、女王扇贝 (*Zygochlamys delicatula*); 鸟蛤的所有种, 包括新西兰鸟蛤 (*Austrovenus stutchburyi*); 新西兰小龙虾 (*Metanephrops challengerii*)、螃蟹、龙虾、小龙虾、对虾、磷虾、鲍鱼 (鲍属 (*Haliotis*) 物种) 以及海胆, 包括新西兰海胆。

[0032] 优选地, 贝类是双壳类动物物种, 并将整个鲜活双壳类动物用作本发明方法中的起始材料。优选地, 在施加酶制剂之前或期间, 使整个鲜活双壳类动物以某种方式裂开或打开。优选地, 双壳类动物在裂开或打开步骤时或直到其之前是活的。

[0033] 优选地, 本发明的方法包括在酶处理步骤之前和/或期间进行的至少一个加温步骤, 以针对酶处理步骤调节贝类和/或激活酶制剂。

[0034] 在加工整个鲜活双壳类动物时, 优选地将加温步骤用于在暴露于酶制剂之前、期间或之后打开或裂开双壳类动物。可替代地, 可将HPP过程用于打开或裂开双壳类动物。其他过程也可用于打开或裂开双壳类动物, 例如将激光构件或局部构件应用于展肌, 或通过刺穿或轻微破裂壳而在双壳类动物的壳中产生小开口。虽然温和的非机械方法是优选的, 但是可以使用实现将双壳类动物的壳的内部至少一部分暴露于酶制剂的目的的任何方法。

[0035] 优选地, 加温步骤通过施加蒸汽 (例如快速蒸汽喷射或注入) 来实现, 以实现和保持最佳加工温度。优选地, 最佳加工温度不超过60°C, 优选地在约20°C-60°C的范围内, 更优选地在约35°C-60°C的范围内。

[0036] 可替代地, 加温步骤可以通过使用热夹套或其他热构件来进行, 以加温贝类并将贝类保持在最佳加工温度下。

[0037] 该或这些酶制剂可包含一种或多种类型的源自动物、植物或微生物来源的酶, 或一种或多种酶与一种或多种酸或碱的组合。

[0038] 优选地, 该或每种酶制剂包含一种或多种选自包含以下项的组的酶: 蛋白水解酶、脂肪酶、昆布多糖酶、磷脂酶、磷酸酶、糖原磷酸化酶、葡糖基转移酶、葡糖苷酶、蛋白酶、胶原酶、糖原脱支酶、磷酸葡萄糖变位酶、纤维素酶、几丁质酶、多糖酶、二糖酶、褐藻酸酶、淀粉酶、麦芽糖酶、肽酶、胃蛋白酶、凝血酶、胰蛋白酶、 α -淀粉酶 (来自发芽谷物)、 β -淀粉酶 (来自甘薯或发芽谷物)、猕猴桃素 (来自猕猴桃)、无花果蛋白酶 (来自无花果)、菠萝蛋白酶 (来自菠萝)、木瓜蛋白酶 (来自木瓜) 以及衍生自以下微生物的酶: 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、嗜酸普鲁兰芽孢杆菌 (*Bacillus acidopullulyticus*)、嗜碱芽孢杆菌 (*Bacillus halodurans*)、蜂蜜曲霉 (*Aspergillus melleus*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)、米黑根毛霉 (*Rhizomucor miehei*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、绳状青霉 (*Penicillium funiculosum*)、里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、乳酸克鲁维酵母

(*Kluyveromyces lactis*)、浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)、细丽毛壳(*Chaetomium gracile*)、淡紫青霉(*Penicillium lilacinum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、*Disporotrichum dimorphosporum*、特异腐质霉(*Humicola insolens*)、埃默森篮状菌(*Talaromyces emersonii*)、代氏根霉(*Rhizopus delemar*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、雪白根霉(*Rhizopus niveus*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、卡门柏青霉(*Penicillium camembertii*)、皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)、爪哇毛霉(*Mucor javanicus*)、萎地青霉(*Penicillium roquefortii*)、少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)、紫红链霉菌(*Streptomyces violaceoruber*)、克雷伯氏肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*)、茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、密苏里放线菌(*Actinoplanes missouriensis*)、树状微杆菌(*Microbacterium arborescens*)、橄榄链霉菌(*Streptomyces olivaceus*)、橄榄产色链霉菌(*Streptomyces olivochromogenes*)、鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)、锈赤霉链霉菌(*Streptomyces rubiginosus*)和溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)。

[0039] 该或这些酶制剂可进一步包含一种或多种选自包含以下项的组的酸或碱：磷酸、硫酸、丹宁酸、柠檬酸、酒石酸、氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化镁和氢氧化钾。

[0040] 优选地，在该或每种酶制剂中使用酶的组合，其中每种酶或酶的组合适合作用于贝类起始材料中存在的一种或多种目标底物。

[0041] 优选地，如果在第一或随后酶处理步骤中使用不同的酶制剂，则该不同的酶制剂包含适于进一步水解或液化一种或多种非蛋白目标底物的酶。

[0042] 优选地，该或每种酶制剂包含至少一种适合作用于肌原纤维蛋白和/或碳水化合物底物的酶。优选地，该或这些酶选自包含以下项的组：衍生自产枯草杆菌蛋白酶的细菌菌株(包括解淀粉芽孢杆菌)的酶，以及其他类似作用的植物和动物源酶，例如淀粉酶和胰蛋白酶。

[0043] 优选地，该或每种酶制剂包含至少一种适合作用于胶原蛋白底物的酶。优选地，该或这些酶选自包含衍生自地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉的酶的组。

[0044] 优选地，该或每种酶制剂包含至少一种适合作用于肌原纤维和胶原蛋白底物两者的酶。优选地，该或这些酶选自包含半胱氨酸蛋白酶的组。

[0045] 优选地，该或每种酶制剂包含至少一种适合作用于脂质底物的酶。优选地，该或这些酶选自包含米曲霉、糖酶、蔗糖酶、淀粉酶、脂肪酶、磷脂酶、磷酸酶、蛋白酶、酯酶和过氧化氢酶的组。

[0046] 在本发明的一个优选实施例中，该或每种酶制剂包含至少两种选自包含以下项的组的酶的组合：衍生自解淀粉芽孢杆菌的酶、衍生自地衣芽孢杆菌的酶、半胱氨酸蛋白酶和衍生自米曲霉的酶。

[0047] 优选地，基于在该或每个酶处理步骤中待处理的该或每种目标底物的估计量而计算，该或每种酶制剂中包含的该或每种酶的量在0.1%–10%的范围内。

[0048] 优选地，在酶处理步骤之前、期间或之后，在加工过程中不添加水。

[0049] 优选地，在本发明的方法中仅需要一个酶处理步骤。可替代地，可以连续进行一个

或多个酶处理步骤以逐渐处理贝类起始材料中存在的基本上全范围的目标底物。

[0050] 优选地,每个酶处理步骤的持续时间短于120分钟,更优选地短于90分钟,甚至更优选地在15-40分钟范围内。

[0051] 本发明的关键优点在于:仅需要非常短的酶处理步骤即可快速地将目标底物或生物材料与贝类的壳或外骨骼分离,并且基本上将材料液化成乳液状液体组合物的形式。短酶处理步骤有助于避免贝类起始材料中的生物活性组分的降解和氧化。

[0052] 优选地,该方法进一步包括在该或每个酶处理步骤期间进行的搅拌步骤,该搅拌步骤使得贝类能够连续移动并因此更均匀地暴露于酶制剂以及如果采用加温步骤则也暴露于升高的温度。

[0053] 优选地,通过使用筛网、过滤器或筛子或其组合进行分离步骤。可以使用一系列分离和/或随后的过滤步骤来获得具有所需粒度或特定食品基质或乳液状结构的液体组合物,或用于更好地回收某些生物活性组分。

[0054] 优选地,将该或这些分离或过滤步骤之后剩余的材料再循环,并在一个或多个随后的酶处理步骤中用一种或多种不同的酶制剂再处理,使得较大的生物结构进一步液化并转化成较小的颗粒,直至关于贝类起始材料中的基本上所有目标底物,实现具有所需粒度或特定食品基质或乳液状结构或一定水平的生物活性组分的组合物。

[0055] 在本发明的优选实施例中,该方法的主要步骤在单个处理容器或室中进行。优选地,处理室是可以被密封和加压的圆柱形容器。

[0056] 优选地,处理室水平地定向或以倾斜位置定向,而不是垂直定向。

[0057] 优选地,处理室包括至少一个可密封的开口、加热构件、用于酶制剂的定量给料系统、和搅拌构件。

[0058] 优选地,定量给料系统包括连接到位于处理室内的定量给料构件的自动分配装置。

[0059] 优选地,搅拌构件包括能够以多种多样的角度或位置连续或半连续地旋转或搅拌处理室的构件,以实现热量和酶制剂在贝类上和周围的均匀和最大分布。

[0060] 优选地,处理室包括排放系统,该排放系统在酶处理步骤结束时启动,以排出处理室内的热量或蒸汽和压力。

[0061] 优选地,可以在分离步骤之后进行一个或多个过滤步骤,以逐渐减小所得液体组合物的粒度。优选地,在分离步骤之后,在一个过滤步骤中将液体组合物过滤至小于200 μm 的粒度。

[0062] 优选地,处理室包括再循环系统,在该再循环系统中,可将该或这些分离步骤和/或过滤步骤(如果进行的话)之后剩余的材料再循环回处理室,以进行一个或多个随后的酶处理步骤。

[0063] 所得的液体组合物优选地在该或这些分离和/或过滤步骤(如果进行的话)之前或之后稳定化,以使该或这些酶失活并对液体组合物进行巴氏消毒或灭菌。优选地,稳定化步骤通过进一步的蒸汽喷射或注入或借助换热器施加热量而进行,以在短时间内将组合物的温度快速升高至80 $^{\circ}\text{C}$ 以上。可替代地,稳定化步骤通过不涉及热处理的方法进行,例如pH或微滤或超滤方法。

[0064] 在优选的实施例中,将所得的液体组合物进行干燥。

[0065] 根据本发明的进一步方面,提供了一种由整个新鲜贝类起始材料制备干燥组合物的方法,其中该方法包括以本文所述的方式加工贝类起始材料以制备液体组合物,然后进行干燥步骤。

[0066] 优选地,通过低温干燥方式如冷冻干燥或通过快速干燥方式如喷雾干燥、流化床干燥、真空干燥或带式干燥进行干燥。

[0067] 干燥后,可以将干燥的组合物研磨或碾磨成粉末。

[0068] 优选地,将干燥的组合物进一步加工成具有合适添加剂和/或赋形剂的胶囊或片剂形式。

[0069] 本发明的组合物具有增加的生物活性组分产率,由于通过加该工方法产生的独特的食品基质或乳液状结构,预期这些生物活性组分将具有增加的生物利用率。有利的是,在加工过程中或加工后不需要添加抗氧化剂来保持组合物的生物活性。

[0070] 在本发明的进一步方面,提供了一种从双壳类动物物种的整个新鲜贝类制备液体组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0071] 裂开或至少部分地打开双壳类动物的壳或以其他方式暴露双壳类动物的壳内的至少一些材料;

[0072] 将包含一种或多种蛋白水解酶的酶制剂施加于整个新鲜双壳类动物并使双壳类动物与所述酶制剂接触足够长的时间段以基本上将目标生物材料与双壳类动物的壳分离,并基本上液化目标生物材料。

[0073] 优选地,通过在相同的酶处理步骤中使用相同的酶制剂来液化目标生物材料。可替代地或另外地,一种或多种不同的酶制剂可用于相同的酶处理步骤和/或一个或多个随后的酶处理步骤。

[0074] 优选地,该方法包括将壳和任何其他非目标生物材料与液化组合物分离的进一步步骤。

[0075] 优选地,双壳类动物在裂开或打开步骤时或直到其之前是活的。

[0076] 优选地,该酶制剂包含一种或多种适于作用于整个新鲜双壳类动物起始材料的一种或多种目标底物的酶。

[0077] 优选地,双壳类动物是贻贝。更优选地,它们是青口贝。

[0078] 优选地,液体组合物是稳定的乳液状组合物。优选地,该组合物包含微粒和/或微滴和/或纳米颗粒和/或纳米液滴的混合物。优选地,疏水相中的至少一些液滴或小球具有包封这些液滴或小球的层,其中一种或多种脂质或亲脂性生物活性组分位于这些液滴或小球内并受到保护。优选地,亲水相包含分散或悬浮在其中的一种或多种生物活性组分。

[0079] 优选地,双壳类动物通过温和的加温步骤裂开或打开。可替代地,可将HPP过程用于打开或裂开双壳类动物。其他过程也可用于打开或裂开双壳类动物,例如将激光构件或局部构件应用于展肌,或者可以通过刺穿或轻微破裂壳而穿透壳以产生开口,而对壳内生物材料的干扰最小。虽然温和的非机械方法是优选的,但是可以使用实现将双壳类动物的壳的内部的至少一部分暴露于酶制剂的目的的任何方法。

[0080] 优选地,加温步骤通过施加蒸汽(例如快速蒸汽喷射或注入)来实现,以实现和保持最佳加工温度。优选地,最佳加工温度不超过60°C,优选地在约20°C-60°C的范围内,更优选地在约35°C-60°C的范围内。

[0081] 可替代地,加温步骤可以通过使用热夹套或其他热构件来进行,以加温双壳类动物并将双壳类动物保持在最佳加工温度下。

[0082] 优选地,该加温步骤和该或这些酶处理步骤在单个处理容器或室中进行。优选地,处理室是可以被密封和加压的圆柱形容器。优选地,处理室具有如上所述的特征。

[0083] 优选地,处理室水平地定向或以倾斜位置定向,而不是垂直定向。有利地,在加工期间不向处理室添加水。

[0084] 该酶制剂可包含一种或多种类型的源自动物、植物或微生物来源的酶,或一种或多种酶与一种或多种酸或碱的组合,如上文更全面描述的那样。

[0085] 对于加工双壳类动物,优选地,目标底物之一是双壳类动物的展肌,并且酶制剂中的至少一种酶是适于作用于该目标底物的蛋白水解酶,以便于壳的打开。然后可以单独或同时一起或随后施加其他类型的酶以作用于其他目标底物,包括壳内的肉和其他生物材料,包括非蛋白底物。

[0086] 在优选的实施例中,对于加工双壳类动物,酶制剂包含至少一种选自包含以下项的组的酶:衍生自产枯草杆菌蛋白酶的细菌菌株(包括解淀粉芽孢杆菌)的酶和其他类似作用的植物和动物源酶如淀粉酶和胰蛋白酶、衍生自地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和黑曲霉的酶、半胱氨酸蛋白酶、衍生自米曲霉的酶、糖酶、蔗糖酶、淀粉酶、脂肪酶、磷脂酶、磷酸酶、蛋白酶、酯酶和过氧化氢酶。

[0087] 在一个优选实施例中,该酶制剂包含至少两种选自包含以下项的组的酶的组合:衍生自解淀粉芽孢杆菌的酶、衍生自地衣芽孢杆菌的酶、半胱氨酸蛋白酶和衍生自米曲霉的酶。

[0088] 优选地,基于在该或每个酶处理步骤中待处理的该或每种目标底物的估计量而计算,该或每种酶制剂中包含的该或每种酶的量在0.1%-10%的范围内。

[0089] 优选地,连续进行一个或多个酶处理步骤以逐渐液化整个新鲜双壳类动物起始材料中存在的基本上全范围的目标底物。

[0090] 优选地,该或每个酶处理步骤的规定时间段短于120分钟,更优选地短于90分钟,甚至更优选地在15-40分钟范围内。

[0091] 优选地,可以在分离步骤之后进行一个或多个过滤步骤,以逐渐减小液体组合物的粒度。优选地,在分离步骤之后,在一个过滤步骤中将液体组合物过滤至小于200 μm 的粒度。

[0092] 液体组合物优选地在该或这些分离或过滤步骤(如果进行的话)之前或之后稳定化,以使该或这些酶失活并对液体组合物进行巴氏消毒或灭菌。

[0093] 优选地,该方法包括将液体组合物干燥以产生干燥组合物的进一步步骤。

[0094] 优选地,干燥组合物在含水介质中具有高溶解度,并且可以再水化以形成稳定的乳液状组合物。

[0095] 在本发明的进一步一方面,提供了通过本文所述的方法之一生产的液体或干燥贝类组合物。

[0096] 优选地,液体和/或干燥贝类组合物包含高产率的生物活性组分或浓缩的活性成分。

[0097] 优选地,液体贝类组合物包含平均粒度分布在0.1-100 μm 范围内的颗粒,包括一些

粒度在1-100nm范围内的纳米颗粒和/或纳米液滴和一些粒度在100nm-1 μ m范围内的微粒和/或微滴。更优选地,液体组合物中的大部分颗粒和/或液滴包含粒度在100-50,000nm范围内,甚至更优选在100-10,000nm范围内的微粒和/或微滴。

[0098] 优选地,液体和/或干燥贝类组合物具有自乳化组合物的性质和/或特性。优选地,干燥组合物与足量的水组合时产生稳定的乳液状组合物。

[0099] 优选地,液体或干燥贝类组合物不含添加的抗氧化剂。

[0100] 可以将液体或干燥贝类组合物分级分离或提取以将组合物分离成脂质或富含脂质的级分和亲水或含水级分。

[0101] 液体或干燥贝类组合物或其级分或提取物可被配制成多种多样的产品,包括但不限于食品、营养品、药品、兽医产品或化妆品。

[0102] 在本发明的进一步方面,提供了一种脂质、富含脂质或疏水的贝类提取物,其中所述提取物通过以下方式产生:通过本文所述的方法制备液体或干燥贝类组合物,或获得由本文所述的方法制备的液体或干燥贝类组合物并从该液体或干燥贝类组合物中提取和回收富含脂质的或疏水的级分。

[0103] 在本发明的进一步方面,提供了一种含水或亲水的贝类提取物,其中所述提取物通过以下方式产生:通过本文所述的方法制备液体或干燥贝类组合物,或获得由本文所述的方法制备的液体或干燥贝类组合物并从该液体或干燥贝类组合物中提取和回收含水或亲水的级分。

[0104] 本发明还可以被广泛地说成是在于本申请的说明书中提到或指出的部分、要素和特征(单独地或共同地),以及任何两个或更多个这些部分、要素或特征的任何或全部组合,并且在本文提及具有已知等效物的具体整数的情况下,此类等效物被视为就像单独地列出一样并入本文

[0105] 定义

[0106] 在本说明书中,除非上下文另有要求,否则以下术语应具有以下定义:

[0107] 如本文结合贝类起始材料使用的“整个”意指贝类,包括它们的壳或外骨骼,它们基本上是完整的且完整的,并且基本上是未加工的。

[0108] 如本文结合贝类起始材料使用的“新鲜”意指是活的或在加工开始前死亡时间不超过12小时,但优选地在加工开始前死亡不超过三小时的贝类。

[0109] “生物活性组分或生物活性化合物”意指对活生物体、组织或细胞或基因有影响的任何一种或多种化学分子、元素或化合物,并且包括对或可能对人类和其他动物的健康或福祉有益的任何一种或多种分子、一种或多种元素或一种或多种化合物或其组合。

[0110] “食品基质”意指本发明的组合物的营养和结构化材料(包括营养和非营养组分)及其相互之间的分子关系(即化学键)。

[0111] 本发明上下文中的“乳液状组合物”意指类似于乳液或胶体的液体组合物,该组合物包含至少一个亲水相或连续相和至少一个疏水相或分散相,并且还可以包含一些在溶液或悬浮液中的固体颗粒。该术语包括胶体悬浮液、胶体乳液和胶体分散体。

[0112] “乳液”包括所有类型的乳液,包括巨乳液、单乳液、双重乳液、多重乳液、微乳液、纳米乳液、胶体乳液和乳化悬浮液。

[0113] “酶制剂”意指包含至少一种酶的制剂,并且包括包含一种或多种酶的混合物的制

剂以及包含一种或多种酶和一种或多种其他非酶物质的制剂。

[0114] 如本文所用的“打开”或“裂开”旨在包括实现将双壳类动物的壳的内部的至少一部分暴露于酶制剂的目的的任何方法。

[0115] 如本文所用的“自乳化”是指当添加到含水介质中时自发地或仅通过最小程度的搅拌即形成稳定乳液或分散体的组合物。

[0116] 如本文结合本发明的乳液状组合物使用的“稳定”是指当在不搅拌的情况下在室温下保持一小时或更长的时间时未表现出相分离的液体组合物或再水化干燥组合物。

[0117] 如本文所用的“目标生物材料”或“目标底物”是指存在于贝类的壳或外骨骼之上或之中的任何所需生物材料,即壳或外骨骼内的肉(meat或flesh),但也包括存在于壳或外骨骼上的其他材料如壳聚糖、可能存在于壳或外骨骼内的生物材料层(例如,贻贝中存在的珍珠层、棱柱层和角质层(类似皮肤))、韧带、展肌、牙、足丝(或须)、肠和足。

[0118] 描述

[0119] 现在将仅以实例的方式参考附图来描述本发明:

[0120] 图1是根据本发明优选实施例从贝类生产液体或干燥组合物的方法的流程图。

[0121] 图2是可用于本发明的方法的处理室的示意图。

[0122] 图3是结合了图2的处理室的本发明方法的实例的示意图。

[0123] 图4是共聚焦显微镜图像和相关的曲线图,该曲线图显示了由整个鲜活青口贝产生的本发明的液体组合物的粒度分布。

[0124] 图5是显示由整个鲜活青口贝产生的本发明的再水合干燥组合物的粒度分布的曲线图。

[0125] 图6是显示本发明的干燥青口贝组合物的级分与通过常规方法生产的典型干燥青口贝组合物的级分(手工打开壳,提取肉,通过共混而均质化,冷冻干燥并碾磨成粉)的比較的曲线图。

[0126] 图7是显示通过本发明的方法生产的两种干燥青口贝组合物的抗炎活性研究与由常规方法生产的三种干燥青口贝组合物的抗炎活性进行比较的结果的曲线图。

[0127] 图8是显示通过本发明的方法生产的两种干燥青口贝组合物的抗氧化剂活性研究与由常规方法生产的三种干燥青口贝组合物的抗氧化剂活性进行比较的结果的曲线图。

[0128] 图9是显示通过常规加工方法生产的干燥青口贝组合物(以蓝色显示)和通过本发明方法生产的干燥青口贝组合物(以橙色显示)的风味特征的曲线图。

[0129] 图10是显示通过常规加工方法生产的干燥青口贝组合物和通过本发明方法生产的干燥青口贝组合物的味道特征(咸度)的曲线图。

[0130] 图11是在FEI Quanta 450SEM上采集的一些扫描电子显微镜(SEM)图像,显示了通过常规加工方法生产的干燥青口贝组合物和通过本发明方法生产的干燥青口贝组合物的微结构。将样品固定在SEM台上并用碳涂覆以优化可视化。

[0131] 图12是显示通过本发明方法生产并在水中再水化的干燥青口贝组合物的典型微结构的一些SEM图像。

[0132] 图13是显示按照实例3制备和测试的贻贝组合物的COX-2抑制活性的曲线图。

[0133] 图14是显示按照实例8制备和测试的贻贝组合物的COX-2抑制活性的曲线图。

[0134] 以下描述将关于本发明的优选实施例来描述本发明,然而,本发明决不限于这些

优选实施例,因为它们仅仅是为了举例说明本发明,并且可以设想,可以在不脱离本发明的范围的情况下进行对本领域技术人员而言将显而易见的可能的变化和修改。

[0135] 本发明涉及一种加工整个新鲜贝类以获得高产率的液体或干燥组合物的改进方法,这些组合物包含高浓度或高产率的生物活性组分。本发明特别但不一定仅涉及对整个新鲜或鲜活双壳类软体动物物种(优选整个鲜活双壳类动物)的加工,这些物种包括但不限于以下这些:所有贻贝物种,例如新西兰青口贝(*Perna canaliculus*)、亚洲绿贻贝(*Perna viridis*)、地中海蓝贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、紫贻贝(*Mytilus edulus*)、加州贻贝(*Mytilus californianus*)、褐贻贝(*Perna perna*)、韩国贻贝(*Mytilus coruscus*)、智利贻贝(*Mytilus chilensis*)、海湾贻贝(*Mytilus trossulus*)、罗纹贻贝(*Geukensia demissa*)、枣贻贝(*Lithophaga lithophaga*)和淡水斑纹贻贝(*Dreissena polymorpha*); *Brachidontes rodriguezii*; *Perumytilus purpuratus*; *Aulacomya ater*; 合唱壳菜蛤(*Choromytilus chorus*); 偏顶蛤属(*Modiolus*) 贻贝物种、其他股贻贝属(*Perna*) 贻贝物种; 蛤蜊的所有种; 鸟蛤的所有种; 牡蛎的所有种,包括岩牡蛎(*Saccostrea glomerata*)、布拉夫牡蛎(*Ostrea chilensis*)和太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*); 三角斧蛤的所有种(*Phaphies*属种),包括双带蛤蜊(*toheroa*)和双壳贝(*tuatua*); 扇贝的所有种,包括金湾扇贝(*Pecten novaezelandiae*)、女王扇贝(*Zygochlamys delicatula*); 鸟蛤的所有种,包括新西兰鸟蛤(*Austrovenus stutchburyi*)。本发明进一步涉及对甲壳类动物的加工,例如新西兰小龙虾(*Metanephrops challengerii*)、螃蟹、龙虾、小龙虾、对虾、磷虾和其他甲壳类动物、以及其他软体动物如鲍鱼(鲍属(*Haliotis*)种)和棘皮动物,特别是海胆,如基那(新西兰海胆)。

[0136] 本发明的方法不需要使用在加工之前破坏或破碎贝类材料或粉碎贝类肉的机械过程。该方法也不需要高温。该方法涉及至少一个酶处理步骤,该至少一个酶处理步骤包括将至少一种酶制剂施加于整个新鲜(优选鲜活)贝类起始材料保持足够长的时间段以产生液体乳液状组合物。该酶制剂包含一种或多种适于作用于贝类的一种或多种目标底物的酶,以基本上将目标底物与贝类的壳或外骨骼分离,并基本上液化目标底物,即通过将目标底物缩减或分解成液体乳液状组合物。

[0137] 目标底物可以包括存在于贝类的壳或外骨骼之上或之中的任何生物材料,例如壳或外骨骼内的肉(meat或flesh)、存在于壳或外骨骼上的壳聚糖、可能存在于壳或外骨骼内的生物材料层(例如,贻贝中存在的珍珠层、棱柱层和角质层(类似皮肤))、韧带、展肌、牙、足丝(或须)、肠和足。

[0138] 然后可以在酶处理步骤完成时从液体组合物中移除或分离非目标固体生物材料或非目标底物(例如壳或外骨骼和/或其碎片以及任何其他非目标材料)。移除的含钙壳或外骨骼典型地非常干净,因为通过酶处理步骤已经从壳中移除了基本上所有的目标生物材料。

[0139] 本发明的关键在于这些组合物可以直接从整个新鲜(包括鲜活)贝类起始材料生产,而无需在施加酶制剂之前使用任何机械加工方法来减小贝类材料的尺寸或粉碎贝类的肉。将酶制剂直接施加于整个新鲜贝类起始材料不仅从贝类的壳或外骨骼移除所有生物材料,还基本上液化该生物材料。可以在一个步骤中从贝类的壳或外骨骼移除生物材料、均质化和乳化,该步骤不包括提取肉、分解起始贝类材料或减小起始贝类材料的尺寸的机械过

程。与现有技术的酶水解方法相比,该方法还非常快。整个新鲜或鲜活贝类起始材料可以在不到40分钟的单个酶处理步骤中基本上与其壳或外骨骼分离并液化。本发明的方法产生具有如本文所述的显著优点和有用性质的贝类组合物。

[0140] 已经发现,本发明的方法产生似乎具有自乳化组合物的性质的液体乳液状组合物。自乳化性质允许将此类组合物以浓缩形式施用,例如以软凝胶或硬壳胶囊形式施用,预期将在消化道中形成细乳液,使得当口服给予时,存在改善的生物活性化合物吸收。与常规乳液相比,自乳化组合物在与含水介质组合时具有改善的物理稳定性。对本发明的组合物进行了独立测试,这些测试表明这些组合物具有比通过常规加工方法生产的现有技术组合物高得多的稳定性。

[0141] 因此,本发明的方法可用于制备在添加到水或其他含水介质中时自发地自乳化的贝类组合物。这些组合物允许以某一形式递送生物活性组分,由于所得含水乳液的稳定性和均匀性,这些生物活性组分将提供良好且出乎意料地一致的生物利用率。

[0142] 液体乳液状组合物是具有至少两个相即连续相和分散相的稳定组合物,其中至少一个相是疏水相,并且至少一个相是亲水相或含水相,并且该组合物还可以包含在溶液或悬浮液中的一些固体颗粒。优选地,该组合物包含多种粒度的混合物,其平均粒度分布在0.1-100 μm 之间,并且包括一些微粒和/或微滴和/或纳米颗粒和/或纳米液滴。已经发现,本发明组合物中的大多数颗粒是粒度在约100-50,000nm范围内,优选在约100-10,000nm范围内的微粒。已经发现,疏水相中的至少一些颗粒具有包封或围绕这些颗粒或液滴或小球的层,其中一种或多种脂质或亲脂性生物活性组分位于这些颗粒或液滴或小球内并受到保护。颗粒或小球可以是脂蛋白或类似物。疏水相分散和/或悬浮在连续或亲水或含水相中。连续或亲水或含水相包含分散和/或悬浮在其中的一种或多种生物活性组分,这些组分可包括蛋白、肽、氨基酸、碳水化合物、维生素、元素、糖原、多糖、矿物质、牛磺酸、多酚、类胡萝卜素、葡糖胺聚糖和胶原。

[0143] 有利地,本发明方法的主要步骤能够在单个处理容器或室中进行,该处理容器或室基本上将生物材料与贝类的壳或外骨骼分离并将贝类起始材料液化(均质化和基本上乳化),而无需在施加该或这些酶之前使用机械尺寸减小过程。本发明的方法使得能够以稳定的乳液状组合物获得产率增加的生物活性组分。贝类的目标生物材料的液化在很短的时间内实现,浪费很少,产率损失也很小。

[0144] 如图1所示,从整个新鲜(优选鲜活)贝类起始材料生产液体组合物的方法包括以下基本步骤:将至少一种包含一种或多种酶的酶制剂施加于贝类的至少一部分并使贝类与酶制剂接触足够长的时间段以将目标底物与贝类的壳或外骨骼分离,并使目标底物基本上液化。酶制剂首先将肉(meat或flesh)和其他生物材料与贝类的壳或外骨骼分离,然后温和地逐渐将生物材料分解成较小的颗粒,从而释放生物活性组分,这些生物活性组分包括营养素、功能分子和生物活性化合物。然后可以从所得的液体组合物中移除任何残余的非目标材料或底物,即,诸如壳或外骨骼和/或其碎片的固体。优选地,本发明的方法包括加温步骤以激活酶并加速该过程。可以将液体贝类组合物干燥以产生干燥的贝类组合物。本发明的方法可以作为间歇方法进行,或有利地作为连续或半连续方法进行。

[0145] 优选地在收获后尽快清洗和加工整个新鲜(优选鲜活)贝类,以便在新鲜并优选活的时,或至少在死后12小时内且优选三小时内对贝类进行加工。应对贝类进行充分清洗,以

达到食品级标准,例如,通过移除贝类外部的所有污垢、副产物、其他海洋生物和异物。如果在收获后不能快速加工贝类,则可以在加工前将贝类清洗并冷藏(约4°C-9°C下,理想的是7°C)最长48小时,以使得它们仍然是活的。在一些情况下,冷藏可能是优选的,因为海水将自然排出,这会有助于降低水含量以便随后干燥组合物。

[0146] 在收获和清洗之后,进行至少一个酶处理步骤(10),该步骤被设计用于从贝类的壳或外骨骼移除或分离目标生物材料,例如存在于贝类的壳或外骨骼之中或之上的肉和/或其他生物材料,同时温和液化目标生物材料或减小目标生物材料的尺寸,以产生液体乳液状组合物(11)。酶处理步骤涉及将贝类的一种或多种目标生物材料暴露于酶制剂,该酶制剂包含一种或多种适于作用于目标底物的酶。

[0147] 如果贝类是双壳类动物物种,则有利地,可将整个新鲜(优选鲜活)双壳类动物用于本发明的方法。为了加工整个双壳类动物,必须打开或裂开双壳类动物,或以某种方式刺穿或穿透至少一部分壳,以将包含肉和其他生物材料的壳的内部的至少一部分暴露于酶制剂。这优选地通过在双壳类动物活着时施加温和的热量来完成,或者可以通过HPP过程或其他过程例如局限于展肌的激光打开方法来触发裂开或打开而完成。如果使用其他刺穿或破裂方法,则这些方法优选地是对壳内的生物材料造成的干扰最小的温和方法。

[0148] 在本发明的优选实施例中,进行至少一个温和加热步骤或加温步骤。加温步骤可用于两个目的。首先,加温步骤可用于针对酶处理步骤调节贝类。也就是说,使贝类达到最佳温度以通过激活酶制剂而促进酶处理步骤以实现更快的反应。其次,如果正在加工整个鲜活双壳类动物物种,则加温步骤可用于至少部分地打开双壳类动物的壳或在双壳类动物的壳中产生裂隙,使得内部材料暴露于酶制剂。优选地,双壳类动物在裂开或打开步骤时或直到其之前是活的。包含一种或多种经选择以作用于作为目标底物的展肌的蛋白水解酶的酶制剂还优选地用于促进双壳类动物通过加温步骤裂开或部分打开时完全打开。

[0149] 加温步骤可以通过本领域已知的任何方式进行,例如,通过直接或间接地向贝类施加热源。在本发明的优选实施例中,加温步骤通过在约90°C-100°C的温度下施加蒸汽(例如快速蒸汽喷射或注入)而进行,以在贝类中或周围快速达到约35°C-55°C的温度。施加蒸汽的时长将根据几个因素而变化,例如贝类的起始温度、正加工的贝类的量以及所用的加工设备的类型和尺寸。重要的是,加温步骤不能进行太长的时间,并且加工温度得到很好的控制,以避免对贝类中的生物活性组分的热损害。通过快速蒸汽喷射或注入来加温是有利的,因为它非常快。可替代地,加温步骤可以通过使用热夹套或其他热方式来进行,以将贝类加热到最佳温度,但这将是一个较慢的过程。本发明的方法可包括应用一个以上的加热方式或步骤,例如,快速蒸汽喷射和热夹套的组合。例如,蒸汽喷射可以用于将贝类加温到最佳温度,之后可以使用热夹套来维持加工期间所需的特定温度。

[0150] 该或每种酶制剂可包含一种或多种源自动物、植物或微生物来源的酶,或一种或多种酶与一种或多种酸或碱的组合。所有的酶表现不同,并非所有的酶都作用于相同的底物。即使是相同的一般组别中的酶也以不同的方式作用于不同的底物。酶的活性与许多因素有关,包括温度、时间和pH。因此,酶的选择需要考虑所用贝类的物种、要作用的目标底物、所需组合物的形式、所用的加工设备以及将影响和/或促进酶活性的因素。

[0151] 可以在酶制剂中使用的酶的实例包括但不限于以下这些:脂肪酶、磷脂酶、磷酸酶、糖原磷酸化酶、葡糖基转移酶、葡糖苷酶、蛋白酶、胶原酶、糖原脱支酶、磷酸葡萄糖变位

酶、纤维素酶、几丁质酶、多糖酶、二糖酶、褐藻酸酶、淀粉酶、麦芽糖酶、肽酶、胃蛋白酶、凝血酶、胰蛋白酶、 α -淀粉酶(来自发芽谷物)、 β -淀粉酶(来自甘薯或发芽谷物)、猕猴桃素(来自猕猴桃)、无花果蛋白酶(来自无花果)、菠萝蛋白酶(来自菠萝)、木瓜蛋白酶(来自木瓜)以及衍生自以下微生物的酶:解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、嗜酸普鲁兰芽孢杆菌(*Bacillus acidopullulyticus*)、嗜碱芽孢杆菌(*Bacillus halodurans*)、蜂蜜曲霉(*Aspergillus melleus*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、嗜热脂肪地芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)、米黑根毛霉(*Rhizomucor miehei*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、绳状青霉(*Penicillium funiculosum*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、浸麻类芽孢杆菌(*Paenibacillus macerans*)、细丽毛壳(*Chaetomium gracile*)、淡紫青霉(*Penicillium lilacinum*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、*Disporotrichum dimorphosporum*、特异腐质霉(*Humicola insolens*)、埃默森篮状菌(*Talaromyces emersonii*)、代氏根霉(*Rhizopus delemar*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、雪白根霉(*Rhizopus niveus*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、卡门柏青霉(*Penicillium camembertii*)、皱褶假丝酵母(*Candida rugosa*)、爪哇毛霉(*Mucor javanicus*)、娄地青霉(*Penicillium roquefortii*)、少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)、紫红链霉菌(*Streptomyces violaceoruber*)、克雷伯氏肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*)、茂原链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、密苏里放线菌(*Actinoplanes missouriensis*)、树状微杆菌(*Microbacterium arborescens*)、橄榄链霉菌(*Streptomyces olivaceus*)、橄榄产色链霉菌(*Streptomyces olivochromogenes*)、鼠灰链霉菌(*Streptomyces murinus*)、锈赤霉链霉菌(*Streptomyces rubiginosus*)和溶组织梭菌(*Clostridium histolyticum*)。

[0152] 可用作酶制剂或可在酶制剂中使用的目前可商购获得的酶产品的一些实例包括ALCALASE、PROTAMEX、FROMASE、NEUTRASE、PROMOD 31、P.OCHROCHLORON MTCC 517、LIQUOZYME、SPIRIZYME、PROVIA和CELLIC、VISCOZYME、CELLULASE、CELLIC、CTEC3、ALTERNAFUEL、CMAXTM3、J THERM、ACCELLERASE TRIO™、MAXATASE、PESCALASE、FLAVOURZYME、ENZIDASE PTX6L、ENZIDASE LIPASE A2 CONCENTRATE、ENZIDASE 899、ENZIDASE PEP1、LECITASE ULTRA、LIPOZYME TL 100L、AFP、ESP153、FUNGAL LIPASE 8000、HT PROTEOLYTIC CONCENTRATE、FUNGAL PROTEASE CONC 400和PROTIBOND TGR。

[0153] 可以在酶制剂中使用的酸的实例包括:磷酸、硫酸、丹宁酸、柠檬酸、酒石酸。可用于酶制剂的碱的实例包括:氢氧化钠、氢氧化铵、氢氧化镁、氢氧化钾。

[0154] 可以将该或每种酶制剂预混合并施加于贝类,或者可以将该或每种酶制剂的每种组分分别同时地或在一个或多个酶处理步骤的过程中依次施加于贝类。

[0155] 所用的该或每种酶制剂的类型将取决于正在加工的贝类的类型和所得组合物的所需性质,这将导致选择酶制剂所靶向的一种或多种底物(目标底物)。例如,蛋白酶或蛋白

水解酶优选用于蛋白底物,脂肪酶优选用于脂质底物,糖酶优选用于碳水化合物底物,而其他酶优选用于其他底物。因此,可以根据希望作用于的底物来选择酶制剂的特性。不同酶的组合可用于作用于贝类起始材料中存在的任何一种或多种不同的底物,并液化各种底物,从而释放增加量和品种的功能或生物活性组分。酶制剂中可包含酸和碱,以实现用于加工的最佳pH和/或增强某些酶的活性和/或作用于某些生物组分如壳聚糖。

[0156] 所用的该或每种酶制剂的量取决于正加工的贝类的类型以及用户设定的操作参数(例如温度、pH、时间和终点)和所需的产品规格。包含在该或每种酶制剂中的每种酶的量应基于该或每种目标底物的量来计算,该或每种目标底物的量可以基于整个新鲜贝类原料的重量来估计。例如,在一批10kg的贻贝中,将有大约5kg的肉(flesh或meat)和水(剩下的5kg是壳)。5kg贻贝中含有大约12%的蛋白,因此为了有效地液化蛋白组分或基于蛋白的底物,该或每种酶制剂中包含的该或每种蛋白水解酶的量将基于估计的12%的蛋白底物来计算,而不是基于起始贝类材料的质量。优选地,基于在该或每个酶处理步骤中待处理的该或每种目标底物的估计量而计算,该或每种酶制剂中包含的该或每种酶的量在0.1%-10%的范围内。酶制剂中所用的酶的类型、量和比率的选择通常最初将基于首先从壳或外骨骼基本上移除目标生物材料,其次在设定的操作温度和pH下基本上液化目标生物材料所需的最小量。可以设想,可以使用一种或多种不同的酶制剂进行一个或多个酶处理步骤,以逐渐液化贝类起始材料中存在的一系列底物。然后可以针对每个酶处理步骤具体地选择在该或这些不同的酶制剂中使用的酶的类型、量和比率,以便实现每种目标底物的最大分解或转化以释放进一步的生物活性组分或产生所需的最终产品规格。例如,如果在第一或随后酶处理步骤中使用不同的酶制剂来液化目标底物,则不同的酶制剂将优选地包含一种或多种适于进一步水解或液化一种或多种非蛋白目标底物的酶。

[0157] 已经在本发明的方法中测试了许多可商购获得的酶并且它们是有用的。酶的选择通常是在所用的特定操作参数下酶制剂的成本和总效率与考虑所需的最终产品规格之间的平衡。

[0158] 就加工双壳类动物物种(例如青口贝)而言,已发现,使用一种或多种能够靶向展肌中存在的蛋白(例如,肌原纤维蛋白)的蛋白水解酶至少在最初是优选的,以使得壳快速完全打开并将内部的生物材料暴露于酶制剂。然后,其他类型的酶可被包含在相同或不同的酶制剂中,或者在相同或随后的酶处理步骤中施加,以靶向其他蛋白,包括壳上或壳内的肉和非蛋白底物。

[0159] 已经发现在双壳类动物加工中特别有效的酶制剂包含一种或多种选自包含以下项的组的酶:衍生自产枯草杆菌蛋白酶的细菌菌株(包括解淀粉芽孢杆菌)的酶;衍生自地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉和米曲霉的酶;半胱氨酸蛋白酶;糖酶、蔗糖酶、淀粉酶、脂肪酶、磷脂酶、磷酸酶、酯酶和过氧化氢酶。

[0160] 在本发明的一个优选实施例中,该酶制剂包含至少两种选自包含以下项的组的酶的组合:衍生自解淀粉芽孢杆菌的酶、衍生自地衣芽孢杆菌的酶、半胱氨酸蛋白酶和衍生自米曲霉的酶,其中这些酶中的至少一种是蛋白水解酶。

[0161] 优选地,基于在该或每个酶处理步骤中希望作用于的该或每种目标底物的估计量而计算,该或每种酶制剂中包含的该或每种酶的比率在0.1%-10%的范围内。如果使用衍生自解淀粉芽孢杆菌的酶,则优选的浓度为目标底物(蛋白底物)的1%-10%,更优选约

5%–10%。如果使用衍生自地衣芽孢杆菌的酶,则优选的浓度为目标底物(蛋白底物)的约0.5%–6%,更优选约3%–6%。如果使用半胱氨酸蛋白酶如木瓜蛋白酶,则优选的浓度为目标底物(蛋白和肽)的约0.2%–2%,更优选约0.5%–1%。如果使用衍生自米曲霉的酶,则优选的浓度为目标底物(在这种情况下为肽、脂质和/或碳水化合物)的约0.5%–6%,更优选约3%–6%。

[0162] 用于加工贝类的最佳pH在pH 2–9的范围内,优选约pH 4至8,但一些酶可以在较低的pH下起作用。可以根据需要并在必要时在该过程中通过添加合适的酸或碱来调节pH。

[0163] 该一个或多个酶处理步骤优选在温控条件下进行指定的时间段。反应温度优选不超过60°C,并且优选在约20°C–60°C的范围内。总反应时间优选短于120分钟,更优选短于90分钟,更优选在15–40分钟的范围内。应根据所需的最终产品规格计算反应温度和持续时间。反应时间通常基于实现期望的最终产品规格所需的最短时间来设定。已经发现,每个酶处理步骤的持续时间在约15–40分钟之间足以实现显著程度的水解。本发明的一个关键优点在于可以从整个新鲜贝类起始材料非常快速地生产基本上呈液体的组合物。

[0164] 该或这些酶处理步骤可以定制以适应特定的贝类物种。它可以通过向贝类手工定量给料该或这些酶制剂,或借助自动定量给料或分配系统(如下面进一步描述的)进行。

[0165] 该方法可以进一步包括在加温步骤和/或酶处理步骤期间和/或之后的搅拌步骤,该搅拌步骤使得贝类能够连续移动并因此更均匀地暴露于升高的温度和/或酶制剂。连续搅拌或移动使贝类更好地暴露于酶制剂,使得制剂在贝类上广泛且均匀地分布,并且在双壳类动物物种的情况下,在裂开的壳内分布。

[0166] 在该或这些酶处理步骤(10)之后,所得的组合物呈类似于乳液或胶体(11)的液体组合物(典型地具有浆液状稠度)的形式。然后将液体组合物进行至少一个分离步骤(12)以从组合物中移除任何壳、壳碎片、外骨骼碎片或其他大的非目标固体生物材料。分离步骤可以通过本领域已知的任何方式进行,例如,通过使用筛网、过滤器或筛子或其组合。可以进行一系列分离步骤以获得具有所需粒度或特定食品基质的液体组合物,或用于更好地回收某些生物活性组分。优选地,然后将该液体组合物虹吸或排出或以其他方式回收,并在一个或多个随后的酶处理步骤(14)中用包含相同或不同酶的一种或多种酶制剂再处理剩余的材料,使得较大的颗粒进一步液化,直至关于基本上所有贝类起始材料均达到所需的粒度或特定的食品基质或一定的生物活性组分水平。这意味着该过程的浪费最小,产率损失最低。可以设想,来自贝类起始材料的基本上所有生物材料均可以在本发明的方法中液化和乳化,只有干净的壳和外骨骼残余物被分离出来并丢弃或用作其他应用的副产物。如果需要,可以采用一个或多个进一步的搅拌步骤,例如,在分离步骤之前或之后,以进一步均化所得的液体组合物。

[0167] 在本发明的一个优选实施例中,该方法的主要步骤在单个处理容器或室中进行,如图2所示。处理室(20)优选地是可以被密封和加压的圆柱形容器。使用加压容器的一个优点在于,它可用于在将酶制剂施加于贝类之前在HPP过程中(压力范围为200–350MPa)打开或裂开整个鲜活双壳类动物物种的壳。如果使用HPP过程来打开或裂开双壳类动物的壳,则任何加温步骤最有可能通过热夹套而不是蒸汽进行,因为不需要蒸汽来打开或裂开壳。然而,如果在该过程中能够很好地控制蒸汽加温,则这可能仍然是优选的加热方法,因为它只需要低廉的设备并且比HPP更快更容易。如果使用HPP,则可以在HPP过程期间或之后采用加

温步骤以针对酶处理步骤调节贝类。

[0168] 对于分批加工,可以将任何量(例如千克或吨数)的整个新鲜贝类从料斗或其他储存容器放入或传送到处理室(20)中进行加工。处理室可以具有内置的称重传感器,从而可以控制和监控每批的批量。对于连续或半连续加工方法,这可能不是必需的。在处理室中任何时候加工的贝类的量将取决于处理室的内部尺寸和体积。在添加贝类之后,处理室内将需要有一些空隙空间,以保持热量/蒸汽并为移动提供空间。

[0169] 在本发明的优选方法中,处理室水平而不是垂直定向,或者处理室以倾斜位置定向。这避免了对机械压碎步骤的任何需要,并且还避免了向处理室添加任何水的需要。如果使用蒸汽喷射作为加热方式,则可以在不向处理室添加任何其他水的情况下实施本发明的方法。有利地,本发明的方法可以在不添加任何水的情况下进行,或者在该过程中添加非常少的水。这是有利的,因为它降低了与干燥所得的液体组合物相关的成本和时间,同时还具有明显的环境效益。是否需要添加任何水将取决于贝类起始材料的类型和所用加工设备的类型。

[0170] 处理室(20)可以包括至少以下特征和部件:可密封的开口(21);加热构件(22);用于酶制剂的定量给料系统(23);以及搅拌构件(24)。

[0171] 可密封的开口(21)既可用于将贝类引入处理室,也可用于在该或这些酶处理步骤之后排出所得的液体组合物。可替代地,如果需要,特别是当该过程是连续的或半连续的时,处理室可以包括单独的排出口。

[0172] 加热构件(22)可以是蒸汽加热装置,例如位于处理室内的快速蒸汽喷射器或注入器。优选地,蒸汽喷射器或注入器位于室内的某一位置,以使得蒸汽能够被输送到室的中心部分。在另一选择中,加热构件可包括位于处理室的至少一个壁上或附近的加热元件或热夹套或换热器(25),以代替蒸汽喷射器或注入器或与蒸汽喷射器或注入器组合。优选地操作加热构件以将处理室的内部温度升高至约35°C-60°C,以通过使处理室达到激活酶制剂的最佳温度而针对酶处理步骤调节贝类,并且在整个鲜活双壳类动物的情况下,使双壳类动物部分打开或裂开,以使得酶制剂可以分布在壳内。如果使用快速蒸汽喷射或注入作为加热方式,则优选在约90°C-100°C的温度下喷射蒸汽持续预定的时间段(通常非常短,例如在约90-120秒之间),以便快速但温和地将处理室的内部温度升高到最佳温度。蒸汽喷射或注入时间取决于进给原料温度、处理室的尺寸、设备的类型(例如,是否还使用另一加热源,如加热夹套;如果使用的话,是开启还是关闭)、搅拌效率、蒸汽喷射器或注入器的喷嘴尺寸以及喷射的蒸汽量。

[0173] 定量给料系统(23)可以包括可以向其中添加该或这些酶制剂的自动分配装置,该自动分配装置连接到位于处理室内的定量给料构件(26),从而可以控制定量给料。优选地,通过可以具有或包括例如促进酶制剂在贝类上的分布的喷雾嘴的定量给料构件(26)将酶制剂倾倒或喷雾到贝类上。优选地,定量给料构件(26)以使得酶制剂基本上均匀地分布在贝类上的方式定位。酶制剂可以在加温步骤开始之前、同时或之后添加。

[0174] 优选地,处理室(20)或处理室的内容物能够连续或半连续地旋转或搅拌。这为贝类提供了更有效的热量和酶制剂分布。处理室优选地包括搅拌构件,该搅拌构件可以位于处理室的内部或外部,并且可以包括能够移动和/或旋转容器内容物的任何构件,优选地以连续或半连续的方式以及以多种多样的角度或位置,以实现在贝类上和周围的均匀和最大

的热量和酶制剂分布。例如,整个处理室本身可以能够旋转或翻转,优选地沿任何方向(即顺时针和逆时针),并且优选地,可以根据贝类物种和最终产品规格或要求来调节旋转或翻转的速度。可替代地,室可包括如图2所示的内部构件(24),例如适于连续或半连续旋转或混合处理室内内容物的可旋转地安装的可控桨叶或翅片或管状翻滚构件。

[0175] 处理室还可以包括再循环系统(27),由此可以使容器的内容物再循环。例如,酶制剂可以再循环和再利用,或者液体贝类材料可以在该或这些酶处理步骤期间再循环,或可以再循环用于将在虹吸出或移除一些液体组合物后进行的后续酶处理步骤(使用包含相同或不同的酶的酶制剂)。再循环系统可以是从小处理室底部处或附近的出口(29)延伸并提供回到定量给料构件(26)或其他合适入口的流体通路的管道或循环管,该入口可位于或靠近处理室的顶部。

[0176] 可以通过外部温度计等(连接到内部温度探头)监测处理室的内部温度,以使得温度在该或这些酶处理步骤的持续时间内维持在理想的加工温度(低于60°C,优选在55°C-60°C之间)。该温度通过以下方式维持:将加热源(25)设定在所需的温度持续反应时间,或者根据需要并在必要时通过蒸汽喷射器或注入器施加进一步的直接快速蒸汽以保持最佳内部温度。如果使用蒸汽来维持反应温度,则蒸汽加热构件应该能够精确和良好地控制以避免贝类材料过热。

[0177] 第一酶处理步骤的持续时间由基本上从贝类的壳或外骨骼移除或分离目标生物材料并用所选的酶制剂基本上液化目标生物材料所需的时间量确定。通常,酶处理步骤/液化过程总共耗时不到120分钟,更优选总共耗时不到90分钟,但是为了实现一些生物活性组分的完全释放或分解,可能需要更长的时间段。然而,优选地,该或每个酶处理步骤的持续时间为约15-40分钟。反应时间还将取决于正加工的贝类物种的类型、该或这些酶处理步骤期间室内存在的贝类的批量或数量、所用的酶和其他添加剂的类型和比率(即,酶制剂的性质)、搅拌量和所选的加工温度。

[0178] 处理室可以包括排放系统(28),该排放系统在酶处理步骤结束时启动,即,停止或停用处理室并打开排放系统以排出处理室内的热量或蒸汽和压力。处理室中可以存在窗口,使得操作者可以在加工期间的任何时间检查和观察室的内容物。

[0179] 在第一个酶处理步骤完成后,贝类起始材料的目标生物材料将缩减成乳液状组合物或胶体(典型地具有浆液状稠度)形式的主要为液体的组合物,该组合物包含一些固体材料,例如壳及壳碎片和外骨骼碎片,以及含有非目标底物例如足丝(如果不需要的话)的其他固体生物材料。液体组合物从处理室排出(通过可密封的开口或其他排出口),并进行至少一个分离步骤(12)。进行第一分离步骤以从液体组合物中移除残余的壳和/或壳碎片和外骨骼碎片,以及任何其他大的固体非目标材料。干净的壳或外骨骼片可被收集在筛子或其他过滤装置中并丢弃,或通过传送带移入容器中。残余的壳、外骨骼碎片和其他不需要的废料可以进一步加工成其他商业产品(例如用作宠物食品或用于动物饲料的液体或干燥产品,或用于工业用途的须/壳产品)。可替代地,如果希望从该材料中释放某些生物活性组分,则可以在一个或多个随后的酶处理步骤中用一种或多种不同的酶制剂对一些分离的材料进行再处理。

[0180] 在分离步骤之后,可以通过本领域已知的方式,例如通过使用一个或多个孔径逐渐减小的筛网、过滤器或筛子,进行一系列过滤步骤(13)以逐渐减小液体组合物的粒度。优

选地,在分离步骤之后进行至少一个过滤步骤,以便在移除固体后从液体组合中移除(并可能再循环)任何大颗粒。优选地,在分离步骤之后,在一个过滤步骤中,液体组合能够被过滤至小于200 μm 的粒度。如果使用喷雾干燥来干燥组合,则粒度小于200 μm 是有利的。如果采用冷冻干燥或其他干燥方法,则粒度可能不那么重要,并且液体组合可在分离步骤后直接干燥。

[0181] 在分离步骤之后和/或在第一过滤步骤之后剩余的材料(即,非目标生物材料)(包括任何剩余的活性酶制剂)可以被添加回处理室(通过再循环系统或其他方式)并进行一个或多个进一步的酶处理步骤(典型地使用不同的酶制剂)以逐渐液化和乳化剩余材料中的其他底物,以便释放进一步的生物活性组分。

[0182] 液体组合可在该或这些分离或过滤步骤(如果进行的话)之前或之后稳定化(15),以使该或这些酶失活并对液体组合进行巴氏消毒或灭菌以满足食品安全要求。该或这些酶的失活可以通过本领域已知的许多方式实现,例如通过应用快速热处理(例如UHT、HTST、PEF),或通过将液体组合的pH改变为该或这些酶变得失活的pH(即 $\text{pH}<4$ 或 $\text{pH}>10$),例如通过添加酒石酸或其他酸。因为pH稳定剂可能不利地影响液体组合中的一些生物活性组分或导致一些组分的分离/变性,所以优选的稳定化方法是快速热处理。例如,可以使用换热器将组合物的温度快速升高到80 $^{\circ}\text{C}$ 以上持续一短时间(例如最高85 $^{\circ}\text{C}$ 持续5-15分钟)。可替代地,可以在酶处理步骤结束时施加进一步的蒸汽喷射或注入(由温度探头控制),以在启动排放之前将处理室的内部温度升高到该水平。可以使用不涉及热处理的其他稳定化方法,例如微滤或超滤方法。

[0183] 所得的液体组合可以按原样使用,或者可以将其分配到容器中并储存在低温下以供随后使用,或者可以将其立即冷冻以供随后使用。如果将液体组合立即冷冻,则可能不需要酶失活步骤,但是可以在解冻时应用酶失活步骤。

[0184] 在图1中,在分离步骤(12)之后进行干燥步骤(16),以产生干燥的组合。可以使用本领域的任何已知的干燥方法立即干燥液体组合。优选地,通过低温($<80^{\circ}\text{C}$)干燥方式如冷冻干燥,或通过快速干燥方式如喷雾干燥、真空干燥或带式干燥进行干燥。干燥后,可以通过本领域已知的方法将干燥的组合研磨或碾磨成粉末(17)。液体或干燥的组合可以通过一个或多个分离、分级分离或提取步骤(18)进一步加工,以产生各种产品形式。

[0185] 图3提供了本发明的优选方法的更详细的示意图,包括使用如图2所示的处理室并包括随后可能的加工步骤。

[0186] 本发明的方法提供了一种用于贝类物种的大规模商业加工的改进方法,以获得高产率的具有高产率生物活性组分的组合。本发明的方法能够在非常短的时间内将整个新鲜(包括鲜活)贝类转化为高质量的液体或干燥组合。与传统方法相比,加工步骤的数量明显减少,从而减少了加工时间和成本。此外,污染和氧气暴露的风险大大降低,特别是在使用所述的单个处理室来执行该方法的主要步骤的情况下。与常规方法相比,本发明的方法产生极高产率的产物。例如,从整个鲜活新西兰绿唇贻贝的加工中回收的干产率比从其他常规方法实现的产率高约20%-40%。本发明的方法通常得到整个鲜活贝类起始材料的约45%-50%。例如,如果在循环开始时将400kg青口贝添加到处理室中,则在排出时将存在约200kg废弃的壳和壳碎片以及约200L的液体组合。

[0187] 本发明的组合具有增加的生物活性组分产率和意想不到且非常理想的微结构,

预期该微结构将增加生物活性组分的生物利用率。有利的是,在加工过程中或加工后不需要添加抗氧化剂来保持组合物的生物活性。此外,不需要向组合物中添加表面活性剂、助表面活性剂或乳化剂来保持组合物的稳定性。

[0188] 本发明的组合物

[0189] 本发明的方法产生乳液状组合物形式的在独特的食品基质中含有高产率生物活性组分的组合物。该方法首先从贝类的壳或外骨骼移除或分离目标生物材料,然后连续地将生物材料液化成较小的生物学上可行的组分或颗粒,而不使用任何机械方法,从而防止对存在于贝类起始材料中的有益生物活性组分的任何显著损害或破坏。乳液状组合物以液体形式或干燥形式稳定,并且它们包含均匀分布的颗粒、液滴和/或小球或具有合理均匀尺寸和形状的生物分子(如在关于下文实例1的图4和图5中所示,以及在图11和图12中所示)。已经显示这些组合物表现出比现有产品更高水平的生物活性。不需要向组合物中添加抗氧化剂、表面活性剂、助表面活性剂、乳化剂或其他添加剂来保持生物活性或以其他方式稳定组合物。因此,该组合物是完全天然的。

[0190] 本发明的组合物的关键优点之一是由于独特的乳液状结构或食品基质,生物活性组分更容易或轻易被吸收到体内(通过细胞或血流或皮肤或其他组织),因此本发明的组合物具有改善的生物利用率,并且将更有效和一致地递送有益的生物活性组分。不受理论的束缚,发明人相信本发明的方法导致将发生自乳化的自然过程,这意味着存在于本发明组合物中的生物活性组分将通过细胞之间的细胞旁吸收而被容易吸收到体内。文献表明,当口服给予时,自乳化制剂可以改善组合物中存在的生物活性化合物的吸收速率和程度,以及所得血浆浓度曲线的一致性。因此,本发明的组合物的生物活性组分的递送将比现有技术的组合物有效得多。此外,自乳化的性质允许本发明的组合物以浓缩形式施用,例如以包封形式施用,预期将在消化道中的任何目标位置形成细乳液。

[0191] 不希望受理论的束缚,据信本发明的方法释放出天然充当表面活性剂和/或助表面活性剂并因而在自乳化体系或类似物中用作天然溶解度增强剂的生理化学组分。存在于组合物疏水相中的脂质或亲脂性生物活性组分以稳定和均匀的方式分散在连续相或亲水相或含水相中。已经发现疏水相中的至少一些颗粒具有围绕或包封颗粒或液滴或小球的层,其中一种或多种脂质或亲脂性生物活性组分位于小球内并受到周围层的保护。这些颗粒或小球可能是脂蛋白或类似物。组合物的连续相或亲水相具有分散或悬浮在其中的一种或多种生物活性组分,并且还可以包含溶液或悬浮液中的一些固体颗粒。

[0192] 充当表面活性剂和/或助表面活性剂和/或乳化剂的组分可能包含低分子量蛋白和/或肽,因为它们似乎保留在分散于亲水相中的颗粒或小球的表面上。这些物质可以帮助形成结构化颗粒或小球,这些颗粒或小球然后相互排斥,排斥力使它们保持稳定地悬浮在亲水相中。可替代地或另外地,可能的是,这些物质改变组合物的粘度,这可有助于产生和保持疏水性颗粒或小球在亲水相中的悬浮液。

[0193] 本发明的液体组合物的一个具体优点是,与通过常规加工方法生产的对比产品相比,它包含高百分比的小粒度材料。例如,在一项研究中,发明人发现,与通过常规方法生产的大多数粒度在300-1200 μm 范围内的对比产品相比,通过本发明的方法生产的青口贝产品具有约60%的40-50 μm 粒度的颗粒。与通过常规加工方法生产的组合物相比,通过本发明方法生产的组合物的水相中还存在浓度高得多的颗粒或小球。其他研究表明,本发明组合物

中的大多数颗粒是粒度在约100–50,000nm范围内,优选在约100–10,000nm之间的微粒。

[0194] 图11显示了从FEI Nova NanoSEM 450高分辨率、场发射枪扫描电子显微镜(FEG-SEM)获得的由本发明生产的干燥青口贝组合物的微结构的图像,其与通过常规加工方法生产的组合物进行比较。图像显示了颗粒形状和尺寸的明显区别。通过本发明的方法生产的组合物具有小得多且更均匀的颗粒结构和尺寸,包含结构化的球形颗粒。图12显示了用水重构的通过本发明方法生产的干燥青口贝组合物的乳液状结构的典型图像。通过本发明生产的再水化组合物在水性悬浮液中是稳定的,并形成独特的微结构,这些微结构包含含有脂质和蛋白两者的结构化球形生物材料,这些脂质和蛋白可以是脂蛋白或包含脂质双层或类似物的颗粒。图像显示这些组合物包含不同粒度的材料的混合物,包括一些纳米颗粒或纳米液滴和一些微粒或微滴。

[0195] 据信脂质和/或亲脂性生物活性化合物被包封并保护在疏水相中的结构化颗粒内,而其他生物活性化合物则分散或悬浮在亲水相中。

[0196] 由于通过本发明的方法实现的小的均匀粒度(例如,对于青口贝组合物而言,典型地在约0.1–50 μm 之间),因此各种干燥方法均是可能的,包括喷雾干燥。通常不可能在常规加工后使用喷雾干燥来生产干燥的贻贝组合物,因为所得组合物的材料粒度高出十到一百倍,使得难以使用标准喷雾干燥设备有效地喷雾干燥。

[0197] 本发明的液体组合物的稳定性还允许在希望时使用其他直接非热灭菌方法,例如脉冲电场(PEF)或超高温(UHT)、或高温/短时间(HTST)巴氏消毒。通过常规方法制备的不稳定和非均匀的非结构化组合物使得难以使用这些高效的非热灭菌方法。

[0198] 本发明的进一步优点是加工方法产生、释放或释出更多的氨基酸和小蛋白和/或肽,其中一些是必需氨基酸,其中一些是增味剂,其中一些是功能性氨基酸和肽。发明人发现,由于增味氨基酸的量增加,本发明的组合物具有改善的感官属性,包括气味、味道或风味特征。参见图9和图10。图9显示本发明的干燥青口贝组合物具有比现有技术组合物更弱的鱼腥味和草腥味特征,并且它们具有更甜的风味特征。图10显示本发明的干燥青口贝组合物在颗粒表面上具有较低水平的钠和氯化物,因此不太咸。这被认为是由于酶处理过程所致,因为在酶水解期间,钠与该过程中释放的其他氨基酸连接,这些氨基酸不能通过现有技术的加工方法释放。

[0199] 液体和干燥组合物的进一步加工

[0200] 本发明的液体或干燥组合物可以按原样使用,或者以各种剂型配制成其他成品,包括口服剂型、局部剂型和如下所述的用于各种用途的其他剂型。

[0201] 本发明的液体和干燥组合物可以按原样使用或被配制用于多种多样的目的,包括作为食品、食品补充剂、用于食品应用的食物成分,或用于化妆品、药物或营养品应用或兽医应用。可替代地,本发明的液体和干燥组合物可以作为中间产品使用或出售,这些中间产品旨在用于进一步加工成许多不同的提取物和/或产品形式,继而可以用于多种多样的应用,包括食品应用、药物或营养品应用、化妆品应用、兽医应用等。通过本发明的方法生产的稳定和均匀组合物使得它们适于进一步加工以获得预期具有高水平生物活性组分和改善的生物利用率的提取物和其他产品形式。

[0202] 本发明的组合物可以被配制成食品、膳食补充剂、营养组合物、兽医组合物、药物组合物或化妆品。多种剂型是可能的,包括口服剂型,例如片剂、胶囊、干粉形式、油、食品成

分;外用局部剂型,例如乳霜、凝胶、润肤霜、软膏、洗液、敷料如膏药、绷带和医用敷料;以及其他内部剂型,包括可注射形式。

[0203] 本发明的液体和干燥组合物都可以进行一个或多个分级分离、分离或提取步骤,以产生不同的有用产物。例如,组合物可以进一步分离成各种级分,包括但不限于疏水或富含脂质的级分,以及含有水溶性蛋白、肽、氨基酸、核酸、矿物质、碳水化合物、维生素、生物素和其他物质以及水不溶性(高分子量材料)和未溶解蛋白等的亲水性级分。

[0204] 液体组合物的分离和/或分级分离可以通过本领域已知的任何方法实现,例如超滤、纳滤、虹吸或泵出脂肪层或脂肪或脂质级分或乳液层、从固体中筛网过滤分离液体、离心、倾析、三相分离(tricanting)和/或水或溶剂提取方法。干燥组合物的分离和/或分级分离可以通过本领域已知的任何方法实现,然而,关于干燥组合物,优选从亲水性级分中移除富含脂质的级分的溶剂提取方法。这是由于本发明的具有良好可提取特性的干燥组合物的性质和结构所致。

[0205] 富含脂质的和/或亲水的提取物也可以被配制成许多不同类型的如上文和下文所述的形式和产品。由于本发明的液体和干燥组合物中生物活性组分的产率增加,因此提出由其产生的任何提取物将具有增加浓度的生物利用率得到改善的生物活性组分。

[0206] 可能的产品形式的实例

[0207] 可以设想,以下产品形式(非限制性)可以源自本发明的液体或干燥组合物的进一步加工:

[0208] • 油-呈液体形式(包括呈硬壳胶囊形式或软凝胶形式的包封形式)、干燥形式(包括片剂或粉末)或油与载体形式,用于膳食补充剂或药品或营养品、化妆品或兽医产品;

[0209] • 液体(整个贻贝组合物(包括富含脂质的级分)或分级分离的贻贝液体(移除富含脂质的级分,仅留下亲水性级分(包含水溶性和非水溶性级分,或仅包含水溶性级分)),用于膳食补充剂或药品或营养品或化妆品或兽医产品;以任何所需的形式(例如糖浆、酞剂、扁囊剂、呈硬壳胶囊形式或软凝胶形式的包封形式等)包装。

[0210] • 粉末(整个贻贝粉末(包括富含脂质的级分)或分级分离的贻贝粉末(移除富含脂质的级分,仅留下亲水性级分(包含水溶性和非水溶性级分,或仅包含水溶性级分)),用于膳食补充剂或药品或营养品或化妆品或兽医产品;以任何所需的形式(例如胶囊、片剂、小袋等)包装。

[0211] • 任何所需形式的食品成分,用作食品调味料、佐料、现成酱料、膳食等。

[0212] • 宠物食品

[0213] 实例1

[0214] 根据本发明的方法加工青口贝(新西兰绿唇贻贝)。将60kg整个鲜活贻贝加入可密封可加压的处理室中。关闭室,采用在100°C的温度下持续90秒的时间段的加温步骤,其形式为向室内的快速蒸汽喷射。同时,将室旋转(通过外部旋转构件)约5分钟,以实现在室内均匀分布的约45°C-50°C的最佳温度,以便打开或裂开贻贝并针对酶处理步骤调节贻贝。然后打开室,手工添加6%的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量)(液体形式)。酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶(地衣芽孢杆菌,可作为ESP153商购获得)。通过初始蒸汽喷射将处理室的内部温度保持在约55°C-60°C(不需要进一步的蒸汽)。将室旋转约40分钟的时间段。在该时间段结束时,通过启动排放来停用室,排放从室中排出热量和压力。然后将室的内容

物排出到分离筛网上以移除任何残余的壳、壳碎片和任何其他大颗粒。然后将液体组合物通过200 μm 筛网过滤器过滤。图4显示了在该实例中生产的青口贝的所得液体组合物的显微镜图像和相关粒度分布曲线图。粒度范围为1 μm 至100 μm ，大部分粒度介于1 μm -50 μm 之间，高浓度的粒度介于1 μm -10 μm 之间。液体组合物包含具有均匀粒度和分布的悬浮颗粒(在含水介质中)的乳液状结构。该乳液可以是包含低分子量蛋白/肽和似乎保留在油/水滴的表面上并有助于稳定组合物的其他物质的双重或多重乳液。

[0215] 在分离和过滤步骤之后，通过冷冻干燥将液体组合物干燥，无需任何稳定化步骤。图5是显示在本发明的该实例中生产的干燥青口贝组合物的粒度分布的曲线图。将干燥的组合物再水化。粒度范围为1 μm 至100 μm ，大部分粒度介于1 μm -50 μm 之间。

[0216] 在该实例中，获得约45%-50%的液体组合物产率(即，约25-30L的液体组合物)。由此，获得约6%-7%的干燥组合物产率(即，约3-4kg)。干燥组合物的水分含量低于6%。干燥组合物是高度可溶的并且可以在水溶液中容易地再水化以实现与原始液体组合物基本相同的稳定组合物(如图4所示)。

[0217] 图6提供了对通过该实例中描述的方法生产的干燥青口贝组合物的主要组分的分析。如图6所示，通过本发明方法生产的组合物的组分不同于通过典型常规方法生产的干燥组合物的组分(在对比常规方法中，手工打开鲜活贻贝，移除肉(meat或flesh)，切碎，然后冷冻干燥)。在该实例中生产的干燥组合物在其水相中包含约10%的脂质、32%的蛋白和29%的其他可溶性组分，并且包含约2%的脂质、18%的不溶性蛋白和9%的其他不溶性组分。相比之下，通过常规方法生产的干燥组合物在其水相中包含约3%的脂质、5%的蛋白和29%的其他可溶性组分，并且包含约8%的脂质、45%的不溶性蛋白和10%的其他不溶性组分。本发明的组合物在水相中包含含量高得多的可溶性蛋白。

[0218] 鉴于存在于贻贝中的生物材料的组成在各季节之间变化，本发明的干燥组合物可能包含约7%-16%的脂质和45%-55%的蛋白。有利地，预期本发明的干燥组合物可在其水相中包含>85%的可溶性蛋白和其他可溶性组分。相比之下，通过常规加工生产的干燥组合物典型地在其水相中仅包含约25%的可溶性蛋白和其他可溶性组分。

[0219] 图6显示在本发明的组合物中存在超过70%的亲水性级分，其几乎是通过常规加工方法生产的组合物中的37%亲水性级分的两倍。这证明了通过本发明方法获得的乳液状组合物的非常高的产率，该组合物具有高度生物可利用形式的更多生物活性组分。可以设想，可以使用一种或多种不同的酶制剂在本发明的方法中进一步加工不溶性部分，以分解或转化不溶性材料以释放进一步的生物活性和可溶性组分。

[0220] 生物活性研究

[0221] 与通过常规加工方法制备的三种其他干燥贻贝提取物相比，测试了实例1的干燥组合物以及以相同方式制备但通过喷雾干燥而非冷冻干燥所干燥的另一种干燥组合物的抗炎特性。

[0222] 通过确立测试样品抑制嗜中性粒细胞激活(如通过超氧化物的产生而度量)的能力来确定它们的相对抗炎特性。测试样品的功效参考阿司匹林以及无补充的对照组。

[0223] 测试样品的详细信息及其所用的制备方法如下表所示：

[0224]

样品编号	描述
1	竞品 A(通过机械压碎和均质化然后干燥的常规方法制备的整个干燥青口贝提取物)
2	竞品 B(通过机械压碎、离心然后冷冻干燥的常规方法制备的整个干燥青口贝提取物)
3	样品 1(通过手工打开贻贝、共混肉并冷冻干燥的常规方法制备的整个干燥青口贝提取物)
4	样品 2(通过本发明的方法(采用冷冻干燥)制备的整个干燥青口贝提取物)
5	样品 3(通过本发明的方法(采用喷雾干燥)制备的整个干燥青口贝提取物)

[0225] 样品1、2和3(实际上在上表中编号为样品3、4和5)由同一批贻贝产生。将每个上述测试样品用乙醇以1:10(w:v)的比率提取,然后将残余物用蒸馏水以相同的比率提取,以使得可以测试每个测试样品的富含脂质的或疏水的级分以及亲水的或含水的级分的活性。用于确定测试样品对炎症的影响的实验程序基于Tan, AS和Berridge, MV (2000) 中描述的方法。由激活的嗜中性粒细胞产生的超氧化物有效地将四唑盐WST-1还原产生可溶性甲臃:a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening of anti-inflammatory agents.[用于测量呼吸爆发激活和筛选抗炎剂的简单比色测定法]J Immunol.Meth.[免疫学方法杂志]238:59-68。从大鼠全血中收获嗜中性粒细胞,并用佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)激活。然后在每种测试样品和对照的存在下温育并培养激活的嗜中性粒细胞。测量WST-1染料的还原以确定超氧化物的产物。对照组设定为100%活性(0%抑制),并将所有样品的抑制与该参照进行比较。阿司匹林是已知的抗炎化合物,因此进行了参考测试,并在400 μ g/ml的浓度下表现出50.2%的抑制(在100 μ g/ml的浓度下表现出16.5%的抑制,且在200 μ g/ml的浓度下表现出48.12%的抑制,显示出剂量响应效应)。

[0226] 基于激活的嗜中性粒细胞对超氧化物的抑制,以400 μ g/ml测试来自每个测试样品的乙醇和水提取物(富含脂质的和亲水的级分)的抗炎活性。将每次提取的产率与每种提取物的活性一起用于获得每个测试样品的两种级分的总活性的估计值。结果如下表所示。

[0227] 乙醇提取物-测试抗炎活性的每个样品中脂质级分的相对贡献

[0228]

样品编号	总重量 的%	抑制%(400 μ g/ml)	实现 100%炎症抑制所需的 粉末重量 (mg)
1	6.22	81.01	7.9
2	6.13	100	无法确定
3	8.92	100	无法确定
4	8.58	98.86	4.71
5	10.05	100	无法确定

[0229] 水提取物-测试抗炎活性的每个样品中亲水性级分的相对贡献

[0230]

样品编号	总重量的%	抑制% (400 µg/ml)	实现 100% 炎症抑制所需的粉末重量 (mg)
1	55.09	26.26	2.96
2	41.37	30.09	3.43
3	39.68	37.28	2.97
4	85.02	28.6	1.8
5	81.21	35.47	1.56

[0231] 结果表明,所有样品均显示出一定程度的抗炎活性,其中脂质级分的活性高于亲水性级分的活性。然而,令人惊讶地发现,亲水性级分中存在抗炎活性,因此贻贝提取物的脂质和亲水性级分都有助于测试样品的总体抗炎活性。然而,从结果清楚地看出,通过本发明方法产生的测试样品比通过常规加工方法产生的测试样品具有高得多的亲水性级分产率(几乎高50%)。图7是曲线图,显示了基于阿斯匹林当量(400µg/ml)的IC₅₀,该研究在测试样品(即组合的脂质和亲水性级分)的总生物活性方面的结果。该曲线图表明,通过本发明方法产生的测试样品显示出比通过常规加工方法产生的测试样品高得多的生物活性水平。通过本发明的方法产生的测试样品的亲水性级分的高产率与脂质级分的良好产率和高活性的组合使整个提取物的整体生物活性增加。只需极小剂量的通过本发明方法产生的测试样品的亲水性级分即可实现100%的抑制。类似地,只需极小剂量的整个提取物即可实现100%的抑制。结果表明,通过本发明的方法产生的生物活性组分的产率增加。

[0232] 该研究的结果得到后续研究的进一步支持,该后续研究对相同的测试样品(五种乙醇提取物和五种水提取物)进行,以评估每种测试样品的DPPH清除活性。

[0233] 使用DPPH清除方法(即,通过使用稳定的自由基2,2-二苯基-1-(2,4,6-三硝基苯基)肼基作为底物)测试每种样品的抗氧化活性。虽然DPPH方法不是直接的抗炎测定法,但抗氧化活性已成为许多研究案例中抗炎活性的指标。在0.1mM乙醇中配制DPPH溶液,并在使用前在黑暗中保持在冰箱中。阳性对照是在含有柠檬酸和NaHPO₄的缓冲液(pH 5)中配制为0.1mg/ml的抗坏血酸。将等量的样品溶液和DPPH溶液一起加入,并将测定管或板在黑暗中温育30分钟,然后在分光光度计上在517nm处进行吸光度测量。在每个样品的空白对照实验中,用乙醇代替DPPH。在DPPH空白对照实验中,用配制样品的介质(水或溶剂)替换样品。

[0234] 清除活性(DPPH抑制%)通过样品吸光度与仅DPPH的吸光度的百分比来计算:

$$[0235] \quad \text{DPPH 抑制 \%} = \left[1 - \frac{(A_{\text{样品}} - A_{\text{样品空白}})}{(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{DPPH 空白}})} \right] \times 100$$

[0236] 所有样品均以10mg/ml的浓度进行测试。结果显示所有样品均具有抗氧化活性(在所有样品中抑制超过80%)。结果汇总在下表中:

[0237] 在水提取样品中的DPPH抑制的IC₅₀值

样品	1	2	3	4	5
[0238] IC ₅₀ (mg/ml)	6.90	2.96	3.72	3.01	3.02

[0239] 在乙醇提取样品中的DPPH抑制的IC₅₀值

样品	1	2	3	4	5
[0240] IC ₅₀ (mg/ml)	8.12	6.34	7.73	4.05	4.50

[0241] 这些结果显示在图8中,该图是曲线图,显示了基于维生素E当量(9.26 μ g/ml)的IC₅₀,该研究在测试样品(即组合的脂质和含水或亲水性级分)的总生物活性方面的结果。从结果清楚地看出,通过本发明方法产生的样品表现出比通过常规加工方法产生的样品更强的抗氧化活性。水提取物和乙醇提取物都有助于整体抗氧化活性。

[0242] 实例2

[0243] 使用与实例1中所述相同的方法加工青口贝(新西兰绿唇贻贝),不同之处在于在酶处理步骤之后进行热稳定化步骤以使酶变性。通过向处理室中施加进一步的蒸汽喷射以将处理室的内部温度升高到>80 $^{\circ}$ C的温度保持约5-15分钟来进行热稳定化步骤。进行该实例是为了确定热稳定化步骤是否对组合物的所得生物活性有任何影响。关于实例2中产生的组合物与实例1中产生的组合物和通过常规加工方法产生的组合物(来自同一批贻贝)相比,进行了进一步的生物活性研究以测定抗氧化活性(通过DPPH清除活性)。发现热稳定化步骤对实例2的组合物的生物活性没有明显影响。该研究的结果显示出与实例1的组合物非常相似的抗氧化活性水平以及与通过常规加工方法产生的组合物相比更高的抗氧化活性。

[0244] 实例3

[0245] 通过将60kg整个鲜活贻贝添加到可密封、可加压的处理室中来加工青口贝(新西兰绿唇贻贝)。关闭室,采用在100 $^{\circ}$ C的温度下持续90秒的时间段的加温步骤,其形式为向室内的快速蒸汽喷射。同时,将室旋转(通过外部旋转构件)约5分钟,以实现在室内均匀分布的约45 $^{\circ}$ C-50 $^{\circ}$ C的最佳温度,以便打开或裂开贻贝并针对酶处理步骤调节贻贝。目标底物是蛋白,并且酶处理步骤涉及施加6%的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量),该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶(解淀粉芽孢杆菌,可作为NEUTRASE商购获得)。没有使用进一步的加热步骤,因为通过初始蒸汽喷射将室的内部温度保持在约55 $^{\circ}$ C-60 $^{\circ}$ C。将室旋转约40分钟的时间段。通过启动排放来停用室,排放从室中排出热量和压力。然后将室的内容物排出到分离筛网上以移除任何残余的壳、壳碎片和任何其他大颗粒。残余的壳和壳碎片非常干净,无论是内部还是外部。将剩余的液体组合物过滤并稳定化。

[0246] 使用环氧合酶(COX,也称为前列腺素H合酶或PGHS)测定法测试实例3中产生的液体组合物以及通过常规机械加工方法产生的两个对照样品的抗炎活性。环氧合酶是一种表现出COX和过氧化物酶两种活性的双功能酶。最近的研究已确立,有两种不同的COX同种型:COX-1和COX-2。COX-1在多种细胞类型中表达,并参与正常细胞生物学。COX-2由促有丝分裂刺激(LPS和细胞因子)诱导,并且在急性炎症条件下负责前列腺素(PG)的生物合成,因此它是非甾体抗炎化合物的抗炎活性的目标酶。理想的抗炎候选物应该仅具有COX-2抑制,而不是COX-1抑制。

[0247] 使用来自美国密歇根州卡曼化学公司(Cayman Chemical Company (MI, USA))的COX-2比色抑制剂筛选测定试剂盒。通过用DMSO介质提取液体组合物将实例3的液体组合物的测试样品制备成100mg/ml,然后将样品在PBS中稀释至5mg/ml的浓度。通过以下方式制备对比样品1:手工打开青口贝,提取肉并使肉均质化,然后用DMSO介质提取成100mg/ml,再将样品在PBS中稀释至5mg/ml的浓度。通过以下方式制备对比样品2:手工打开青口贝,提取肉并将肉在55°C下温育60分钟,然后使肉均质化,接着用DMSO介质提取成100mg/ml,再将样品在PBS中稀释至5mg/ml的浓度。

[0248] 测试结果如图13所示。结果显示,与对比样品1和2相比,通过实例3的方法产生的组合物的提取物具有非常高水平的COX-2抑制活性。

[0249] COX-2抑制活性与抗炎活性有关,并且预期由于本发明组合物的结构和性质,它们包含高产率的具有抗炎活性和改善的生物利用率的生物活性组分,因此将能非常有效地治疗炎症和相关病症。

[0250] 实例4

[0251] 通过将60kg整个鲜活贻贝添加到可密封、可加压的处理室中来加工青口贝(新西兰绿唇贻贝)。关闭室并在温和搅拌下进行加温步骤,以实现在室内分布的约45°C-50°C的最佳温度。该过程涉及两个酶处理步骤。第一步对蛋白底物进行,其中使用6%的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量),该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶(可作为ALCALASE或ESP153或ENZIDASE PTX6L商购获得)(可替代地,可在该酶制剂中使用所有这些酶以各种比率的组合,这些比率构成约6%的总浓度)。将室的内部温度保持在约55°C-60°C持续40分钟。通过启动排放来停用室,排放从室中排出热量和压力。将室的内容物排出并分离。残余的壳和壳碎片非常干净,无论是内部还是外部。将剩余的液体组合物过滤,并将过滤后剩余的材料加回到处理室中,且用不同的酶制剂处理以作用于部分还原的蛋白底物,其中使用5%的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量),该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶(可作为Neutrase商购获得)。将室在55°C-60°C下旋转约30分钟。然后将其停用并收集室的内容物。发现第二次添加酶制剂改善了液体组合物中的可溶性蛋白产率并且显著减小了粒度。

[0252] 实例5

[0253] 根据本发明的方法加工青口贝(新西兰绿唇贻贝)。将60kg整个鲜活贻贝加入可密封可加压的处理室中。关闭室,采用在100°C的温度下持续90秒的时间段的加温步骤,其形式为向室内的快速蒸汽喷射。同时,将室旋转(通过外部旋转构件)约5分钟,以实现在室内均匀分布的约45°C-50°C的最佳温度,以便打开或裂开贻贝并针对酶处理步骤调节贻贝。该方法涉及在25°C-55°C下使用经选择以用于蛋白底物的混合酶制剂,其中使用6%的包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶(可作为ALCALASE或ESP153或ENZIDASE PTX6L商购获得)的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量)与5%(基于蛋白总量)的衍生自米曲霉的另一种酶(可作为FLAVOURZYME或Lecitase® Ultra商购获得)的组合。不需要进一步加热来维持反应温度。将处理室旋转约60分钟。停用室。然后将室的内容物排出到分离筛网上,并将液体组合物通过200µm筛网过滤器过滤。液体组合物包含具有均匀粒度和分布的悬浮颗粒(在含水介质中)的乳液状组合物。发现组合的酶制剂进一步减小了粒度并在液体组合物中实现了更好的味道特征。

[0254] 实例6

[0255] 根据本发明的方法加工青口贝(新西兰绿唇贻贝)。将60kg整个鲜活贻贝加入可密封可加压的处理室中。关闭室,采用在100℃的温度下持续90秒的时间段的加温步骤,其形式为向室内的快速蒸汽喷射。同时,将室旋转(通过外部旋转构件)约5分钟,以实现在室内均匀分布的约45℃-50℃的最佳温度,以便打开或裂开贻贝并针对酶处理步骤调节贻贝。该过程涉及两个酶处理步骤。第一步对蛋白底物进行,其中使用6%的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量),该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶(可作为ESP153商购获得)。将室的内部温度保持在约55℃-60℃。将室旋转约40分钟的时间段。将室停用,然后将室的内容物排出到分离筛网上。过滤液体组合物,将过滤后剩余的材料加回到处理室中,并用不同的酶制剂处理以作用于下列目标底物:胶原、糖胺聚糖和一些复合碳水化合物及蛋白,其中使用约1%的木瓜酶制剂(可作为PAPAIN 6000L商购获得)。如果需要,可以使用衍生自解淀粉芽孢杆菌的替代性酶制剂(可作为ENZIDASE Neutral或NEUTRASE商购获得)。在排出液体组合物之前,将蒸汽喷射到室中以将温度升高至55℃-80℃,反应时间为约30分钟。发现第二酶处理步骤改善了液体组合物中目标底物的可溶性产率。

[0256] 实例7

[0257] 通过将60kg整个鲜活贻贝添加到处理室中来加工青口贝(新西兰绿唇贻贝)。关闭室并采用加温步骤以实现约45℃-50℃的最佳温度。该过程涉及两个酶处理步骤。第一步对蛋白底物进行,其中使用6%的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量),该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶(可作为ENZIDASE PTX6L商购获得)。通过蒸汽喷射将室的内部温度保持在约55℃-60℃。将室旋转约40分钟的时间段。在该段时间结束时,通过启动排放来停用室,排放从室中排出热量和压力。然后将室的内容物排出到分离筛网上以移除任何残余的壳、壳碎片和任何其他大颗粒。过滤液体组合物,将过滤后剩余的材料加回到处理室中,且在30℃-65℃的温度下用包含浓度为约2.5%的胰蛋白酶的酶制剂处理约120分钟,以作用于下列目标底物:复合碳水化合物、脂质和蛋白,然后排出液体组合物。发现第二酶处理步骤改善了目标底物的可溶性产率,也就是说,在可溶性级分中从液体乳液的复合基质中释放出了更多的脂质、游离脂肪酸、碳水化合物和蛋白/肽。

[0258] 实例8

[0259] 根据本发明的方法,使用新鲜的死后贻贝制备了来自相同批次的九个青口贝(新西兰绿唇贻贝)样品,但是使用不同浓度的不同酶来加工每个样品。通过以三种不同的浓度添加包含ESP 153(澳大利亚美商公利洋行(Connell Bros,Australia),批号7947)的酶制剂加工前三个样品,这些浓度基于15%重量的整个新鲜贻贝起始材料,占蛋白总量的0.5%、1%和2%。通过分别以1.5%、3%和6%的浓度添加包含Neutrase 0.8L(丹麦诺维信公司(Novozyme,Denmark))的酶制剂加工接下来的三个样品。通过添加包含分别以10mg、20mg和30mg的量添加的木瓜蛋白酶(美商公利洋行,批号8849)的酶制剂加工最后三个样品。所有水解均在55℃下进行,同时温和搅拌。分别在20分钟、50分钟和90分钟的持续时间后评价水解程度,以评价酶浓度和酶处理时间对水解程度的影响。

[0260] 还测试了实验室对照样品,该对照样品包含来自同一批贻贝的新鲜均质化贻贝肉,该贻贝肉置于55℃的烧瓶中,同时温和搅拌相同的90分钟持续时间(未添加酶)。

[0261] 结果显示,在所添加的所有酶浓度下,在最初的20分钟内,水解速率最快,然后在接近90分钟时减慢至平台期。在所有情况下,随着酶浓度的增加,水解程度略有增加。使用

1%ESP153实现了与3%Neutrased相似的水解程度,使用2%ESP153实现了与6%Neutrased相似的水解程度。使用30mg木瓜蛋白酶实现了与0.5%ESP153和1.5%Neutrased相似的水解程度,表明更高浓度的木瓜蛋白酶更有效。结果表明,不同类型和浓度的酶可以用在本发明的酶制剂中,并且仍然在20分钟内实现生物材料与贻贝壳的有效分离和生物材料的液化。

[0262] 还注意到,在对照样品中发生了低程度的水解,证实了贻贝起始材料中存在内源性蛋白酶并且在均质化后释放了这些酶,从而触发自溶,这将导致贻贝材料中的生物活性组分的损害和降解。

[0263] COX-2抑制活性

[0264] 使用与实例3中所述相同的方法评价了三种上述样品的COX-2抑制活性。从每组三个样品中随机选择一个样品,以便测试使用每种酶制剂产生的一个样品的COX-2抑制活性。如实例3中那样,在90分钟酶处理过程结束时通过用DMSO提取而制备每个样品。样品1来自用2%ESP153处理的批次。样品2来自用1.5%Neutrased处理的批次。样品3来自用0.08%木瓜蛋白酶处理的批次。对照也进行了测试。以5mg/ml的剂量率测试每个样品。结果示于图14中。结果显示,与对照相比,所有样品均实现了良好水平的COX-2抑制活性。鉴于90分钟结束时的水解程度仅略高于20分钟时的水解程度,如果在仅20分钟的酶处理步骤后便测试样品的COX-2抑制活性,则可能获得相同的结果。

[0265] 实例9

[0266] 通过将60kg整个鲜活贻贝添加到可密封、可加压的处理室中来加工青口贝(新西兰绿唇贻贝)。关闭室,采用在100℃的温度下持续90秒的时间段的加温步骤,其形式为向室内的快速蒸汽喷射。同时,将室旋转(通过外部旋转构件)约5分钟,以实现在室内均匀分布的约45℃-50℃的最佳温度,以便打开或裂开贻贝并针对酶处理步骤调节贻贝。该过程涉及对蛋白底物进行的单一酶处理步骤,其中使用组合酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量),该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的两种酶即ESP153和NEUTRASE和一种半胱氨酸蛋白酶即木瓜蛋白酶。该酶制剂包含含量为2%-3%的ESP153和含量为3%-5%的NEUTRASE及含量为0.2%-0.3%的木瓜蛋白酶。没有使用进一步的加热步骤,因为通过初始蒸汽喷射将室的内部温度保持在约55℃-60℃。酶处理步骤的持续时间为60分钟。分离后,残余的壳和壳碎片非常干净,无论是内部还是外部。将液体组合物过滤并稳定化。所得的组合物是稳定的,具有一致的粒度和结构以及目标底物的高可溶性产率。

[0267] 实例10

[0268] 根据实例9的方法加工青口贝(新西兰绿唇贻贝),但进行两个酶处理步骤。第一步对蛋白底物进行,其中使用包含含量为2%的衍生自芽孢杆菌属种的蛋白水解酶(可作为NEUTRASE商购获得)的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量)进行30分钟。没有使用进一步的加热步骤,因为通过初始蒸汽喷射将室的内部温度保持在约55℃-60℃。30分钟后,将另一种包含以下三种其他酶的混合物的酶制剂加入处理室:2%ESP153、60mg木瓜蛋白酶和4%Lecitase Ultra(诺维信公司)。继续再加工60分钟。将室停用,并收集液体组合物。发现第二酶处理步骤改善了液体组合物中目标底物的可溶性产率。所得的组合物是稳定的,具有一致的粒度和结构。

[0269] 实例11

[0270] 通过以下方式加工蓝贻贝(Mytilus edulis):向处理室中添加60kg整个鲜活贻

贝。关闭室并采用快速蒸汽喷射形式的加温步骤同时温和旋转以实现约45°C-50°C的最佳温度。酶处理包括施加6%的酶制剂(基于3-4kg的蛋白总量),该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白水解酶(可作为ALCALASE商购获得)。也可以使用替代性酶,例如ESP153或ENZIDASE PTX6L或NEUTRASE。通过蒸汽喷射将室的内部温度保持在约55°C-60°C。将室旋转约30分钟的时间段。在该段时间结束时,通过启动排放来停用室,排放从室中排出热量和压力。然后将室的内容物排出到分离筛网上以移除任何残余的壳、壳碎片和任何其他大颗粒。将剩余的液体组合物过滤并稳定化。观察到组合物的结构和稳定性与用青口贝制备的那些组合物基本相似,表明本发明的方法无论贻贝种类如何都是有效的。

[0271] 实例12

[0272] 根据本发明的方法加工新西兰鸟蛤 (*Austrovenus stutchburyi*)。将60kg整个鲜活鸟蛤加入可密封、可加压的处理室中。关闭室,采用在100°C的温度下持续90秒的时间段的加温步骤,其形式为向室内的快速蒸汽喷射。同时,将室旋转(通过外部旋转构件)约5分钟,以实现在室内均匀分布的约45°C-50°C的最佳温度,以便打开或裂开鸟蛤。施加6%的酶制剂,该酶制剂包含衍生自芽孢杆菌属种的蛋白酶。通过初始蒸汽喷射将室的内部温度保持在约55°C-60°C。将室旋转约20分钟的时间段。将室停用,并将室的内容物排出到分离筛网上。将液体组合物过滤并稳定化。观察到组合物的结构和稳定性与用贻贝制备的那些组合物基本相似,表明本发明的方法无论双壳类动物物种如何都是有效的。

[0273] 优点

[0274] 本发明的方法和组合物具有以下可能实现的优点:

[0275] a) 所得液体和干燥组合物中生物活性组分的产率增加;

[0276] b) 利用贝类起始材料之中或之上存在的基本上所有有用的生物材料,意味着非常少的浪费或产率损失;

[0277] c) 液体和干燥组合物的定量收率均更高;

[0278] d) 过程更快(整个鲜活贝类可在不到两小时内被加工,但通常在不到40分钟内被加工,这是相比需要花费数小时的现有技术酶水解方法的巨大进步);

[0279] e) 工艺得到简化(与现有技术工艺相比,所涉及的步骤明显更少,所涉及的设备也更少);

[0280] f) 工艺不需要使用机械技术或者会变性或破坏生物活性组分的高温;

[0281] g) 由于所需的设备更少、时间更短、步骤更少,所以工艺更经济有效;

[0282] h) 许多可能的最终产品,包括中间产品和成品;

[0283] i) 最短的处理时间和加工,意味着贝类生物活性组分的污染、氧化、损失、损害或降解的可能性大大降低;

[0284] j) 所得组合物的特性允许使用多种干燥选择,并且允许使用多次分级分离、分离和提取过程以进行进一步的提取和/或制备进一步的产品形式;

[0285] k) 该方法产生高度可溶的提取物,这些提取物更容易配制,从而为进一步加工和使用提供更多选择;

[0286] l) 在本发明的方法中不需要添加抗氧化剂;

[0287] m) 组合物具有改善的感官属性,包括气味、味道和风味特征,并且这些改善的感官属性使组合物适用于许多不同的应用;

[0288] n) 组合物具有乳液状组合物和/或自乳化组合物形式的独特食品基质,它们在含水介质中具有高溶解度并且由于增加的被吸收到体内的能力而具有高生物利用率。高度期望的脂质或亲脂性生物活性组分被天然保护或包封在组合物中,从而提高这些期望的生物活性化合物的生物利用率和功效。

[0289] o) 组合物是天然稳定且完全天然的,因为它们形成天然乳液状组合物,不需要添加任何表面活性剂、助表面活性剂或其他乳化剂或添加剂来稳定组合物。

[0290] 变型

[0291] 当然可以认识到,虽然通过本发明的说明性实例给出了上述内容,但是对于本领域技术人员来说将显而易见的所有这些及其他修改和变型都被认为落在如前文所述的本发明的广泛范围和范畴内。

[0292] 虽然实例显示了使用某些酶和/或酶组合进行的方法,但这些仅显示了一些优选的酶制剂。可以设想,大多数可商购获得的酶在本发明的方法中将是有效的,并且酶本身的实际选择是通过参考许多因素来确定的,例如每种酶的最佳加工温度和pH、每种酶类型获得足够程度的水解通常所需的时间、不同类型的酶的相应成本和一般可获得性。此外,应考虑贝类的种类和贝类的目标底物以及所需的最终产品和规格。

[0293] 在实例中,主要将贻贝用作起始贝类材料。然而,可以预期的是,该加工方法对于其他贝类物种将以类似的方式起作用,并且即将开展试验来证明这一点。初步的研究表明,能够用不同的贻贝物种和不同的双壳类动物物种实现类似结构化并因此有利的组合物。不同的酶可能需要与不同的贝类物种一起使用,具体取决于它们的生物组成。存在于由不同贝类物种产生的最终产品中的生物活性组分将根据物种而不同,但是可以设想,贝类起始材料中存在的大比例的可能有益的生物活性组分将在本发明的组合物得到回收并具有高生物利用率。其他可能有益的生物活性组分也可通过本发明的方法释放。

[0294] 还应理解,如果如本文所述或要求保护的产品、方法或过程作为单独的组成部分或作为“套盒”不完整地出售,或者作为单独或分开的步骤执行,则这种利用也将落在发明的范畴内。

[0295] 为了下文的描述,术语“上”、“下”、“右”、“左”、“垂直”、“水平”、“顶部”、“底部”、“横向”、“纵向”、“侧面”、“前”、“后”及其派生词应涉及按照在附图中定向的本发明。然而,应该理解,除非明确地相反指出,否则本发明可以采用各种替代变型。还应理解,附图中示出的以及以下说明书中描述的特定装置仅仅是本发明的示例性实施例。因此,与本文披露的实施例相关的具体尺寸和其他物理特性不应被视为限制性的。

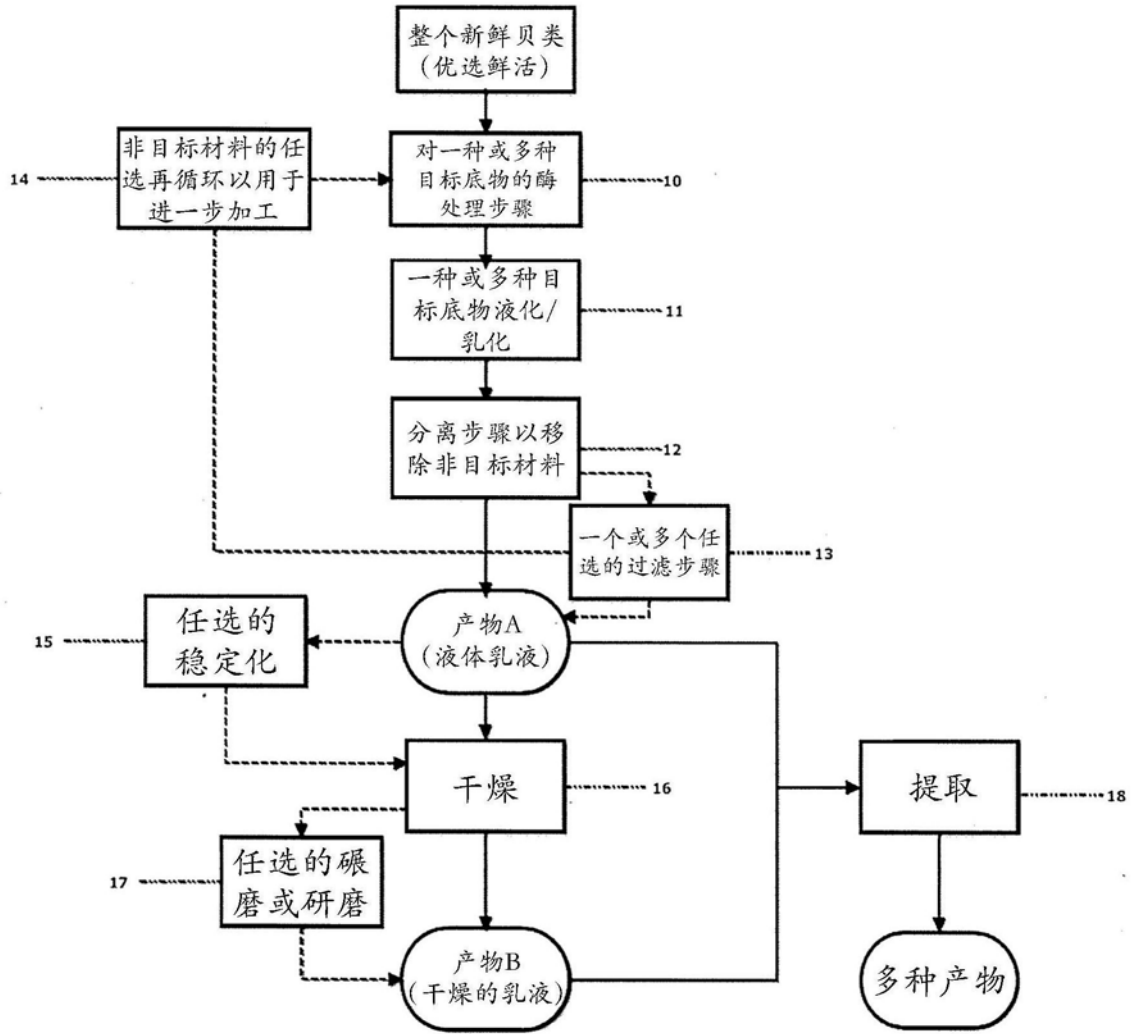


图1

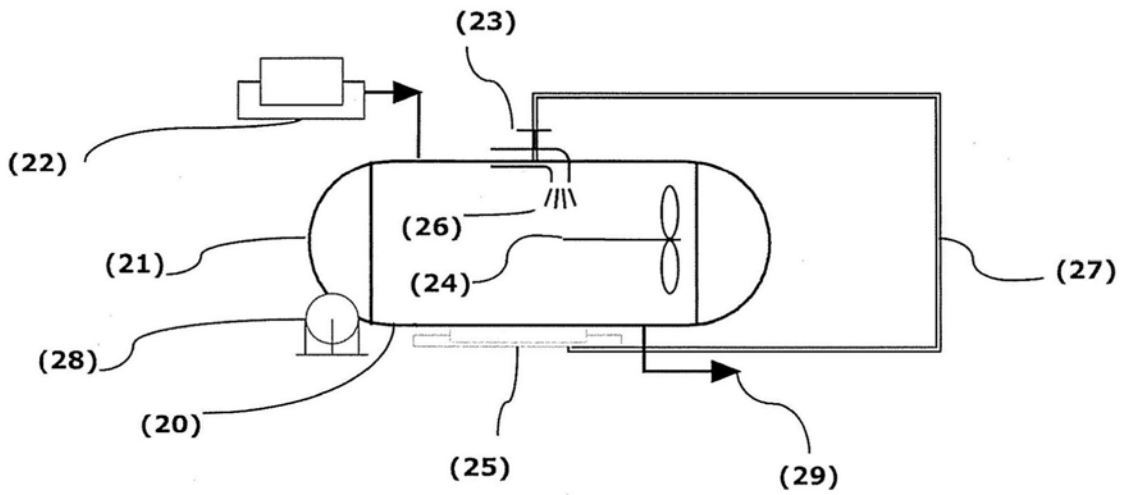


图2

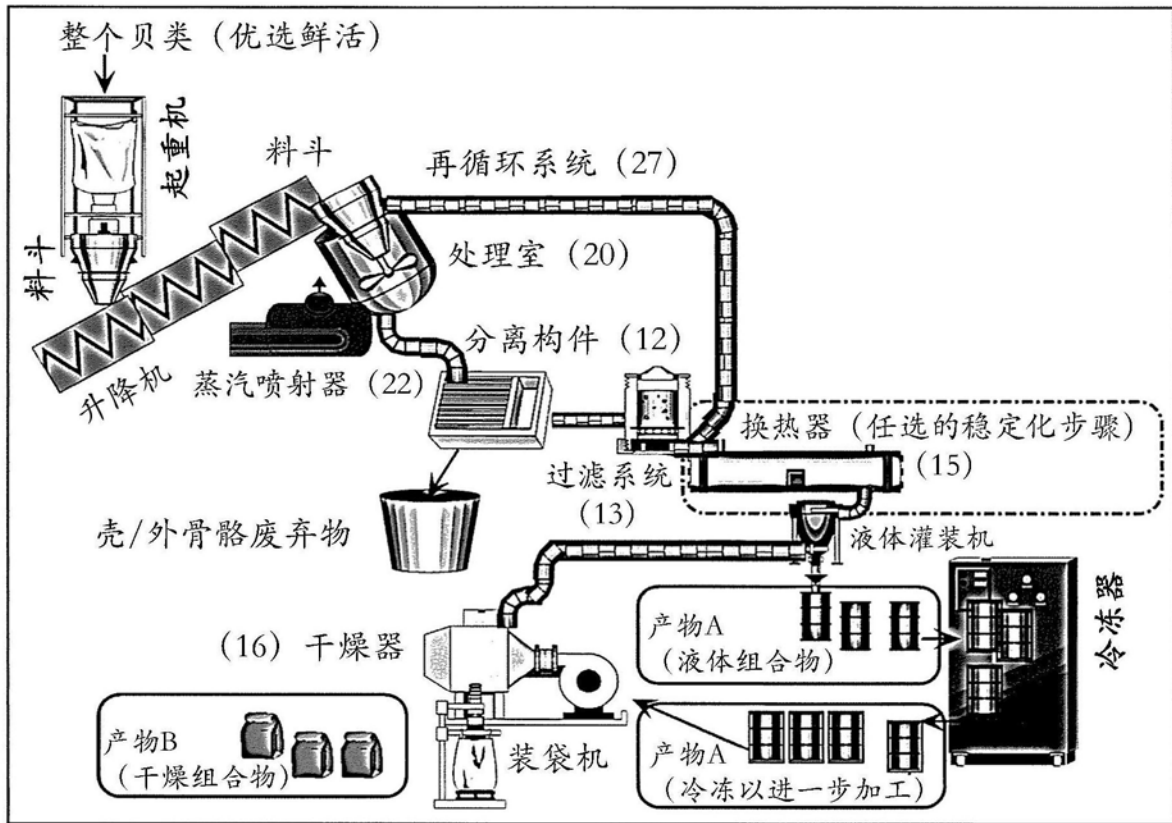


图3

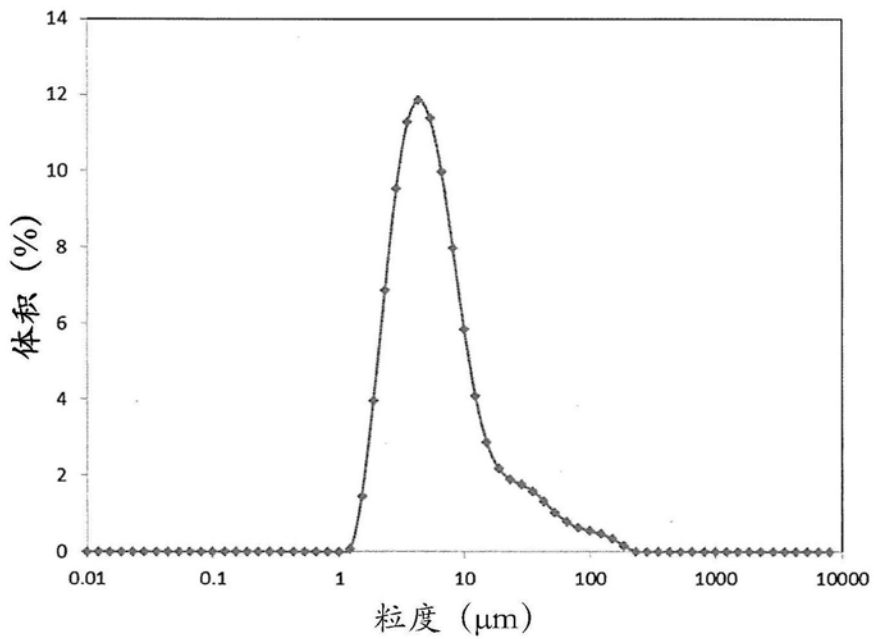
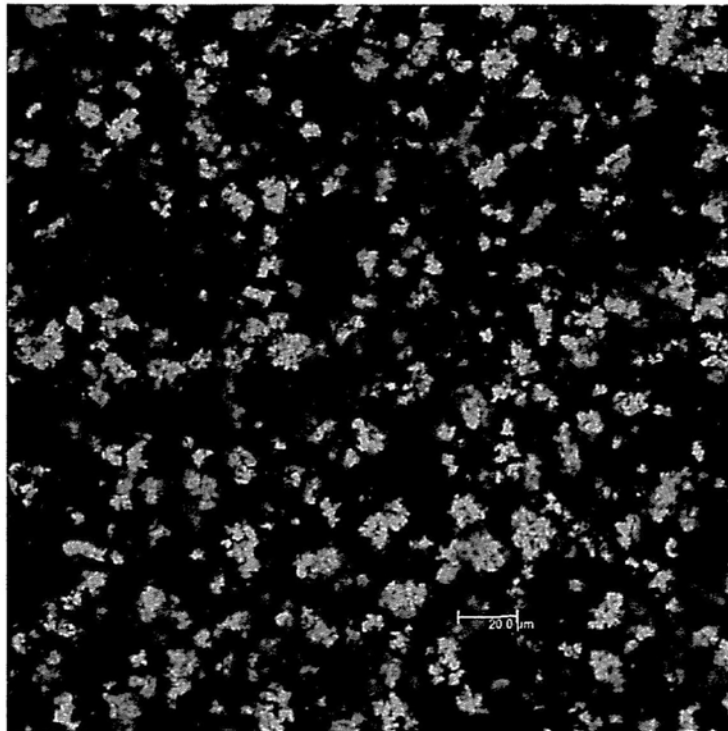


图4 - 由青口贝产生的本发明的液体组合物的共聚焦显微镜图像 (上) 及相关的粒度分布分析。

图4

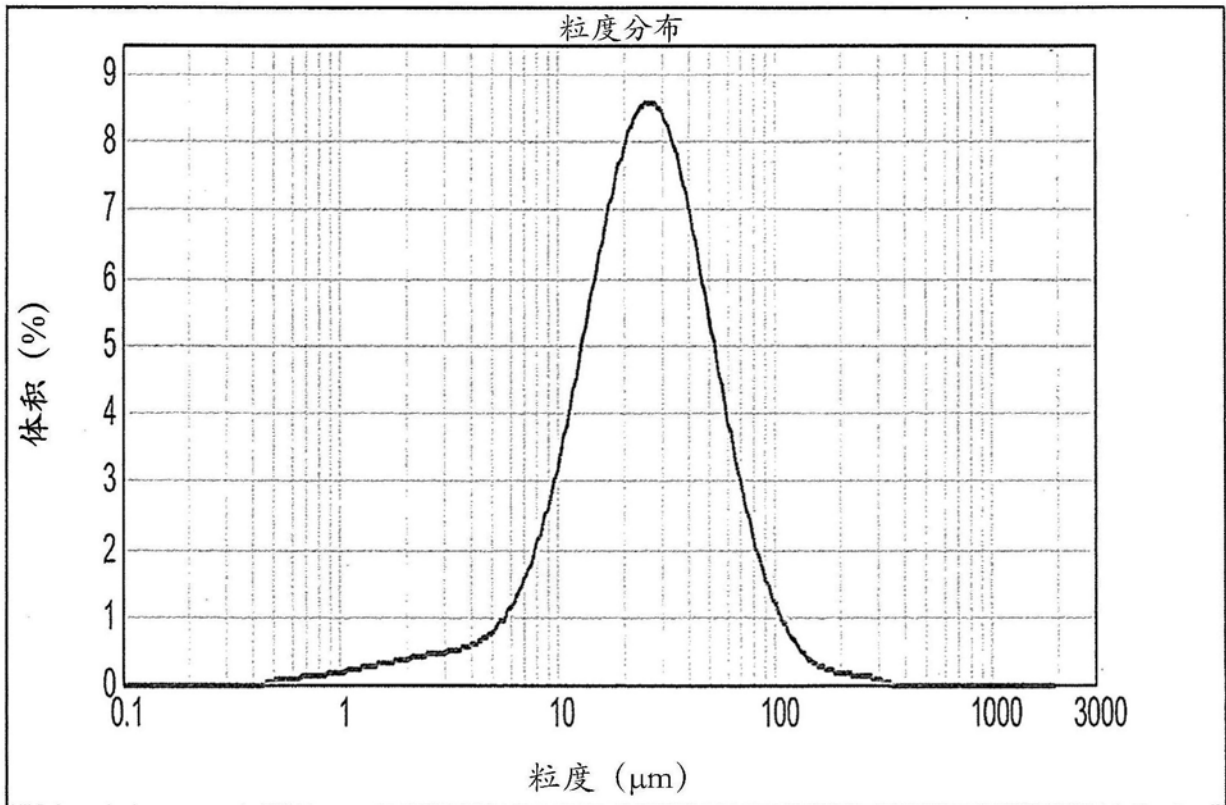


图5 - 由本发明的方法生产的再水化的干燥青口贝组合物的粒度分布分析。

图5

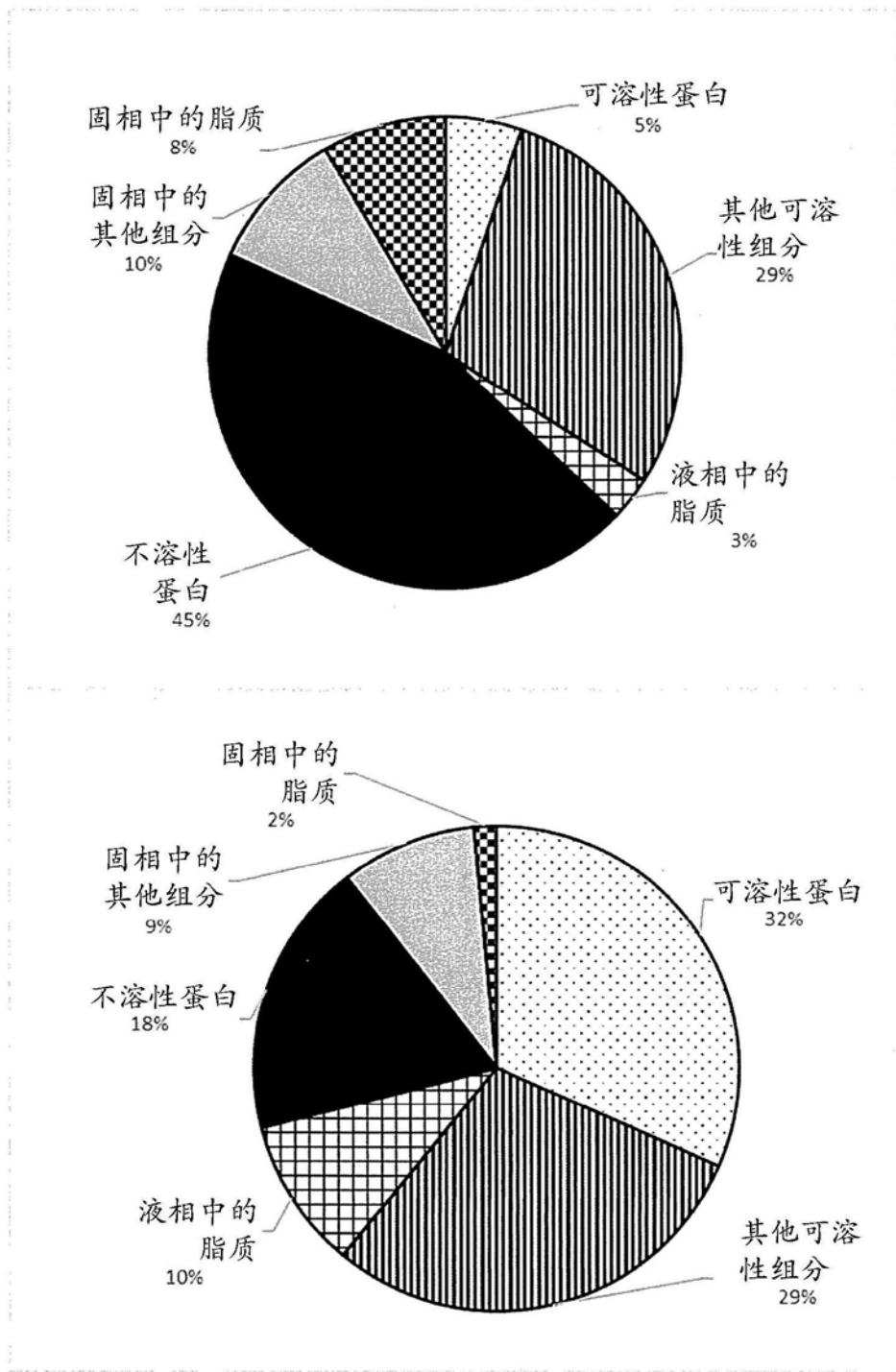


图6 - 通过常规加工方法（上）和根据实例1的本发明的方法（下）生产的干燥青口贝组合物在分级分离以分离疏水和亲水级分后的比较。

图6

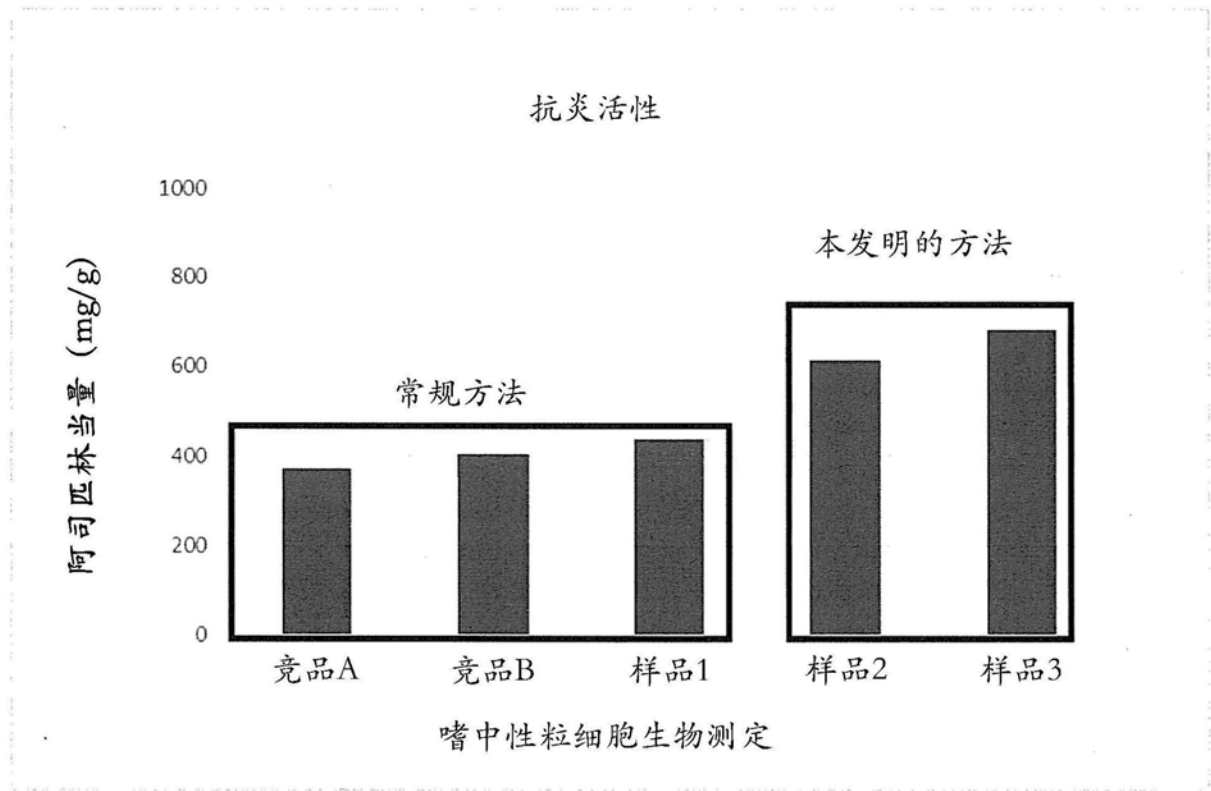


图7 - 本发明的干燥青口贝组合物 (右) 和通过常规方法生产的干燥组合物 (左) 的对比抗炎活性

图7

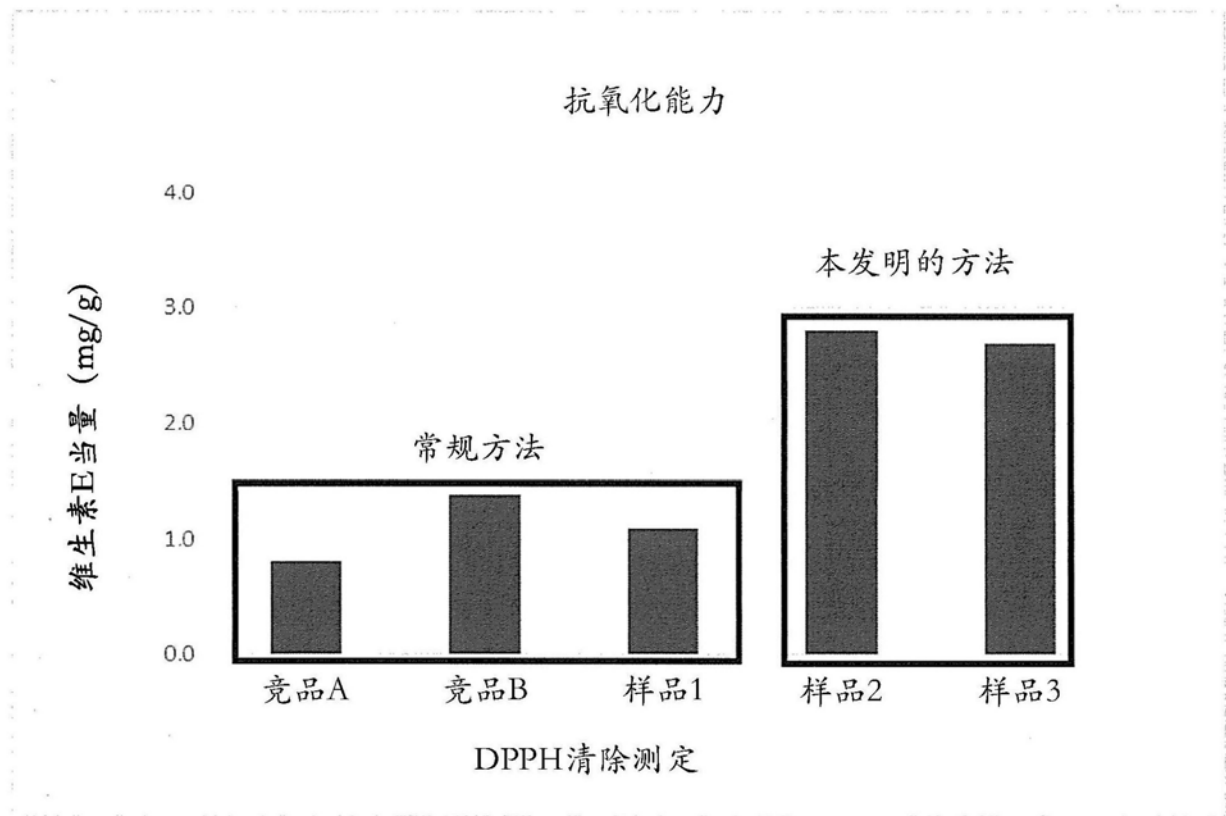


图8 - 本发明的干燥青口贝组合物（右）和通过常规加工方法生产的干燥组合物（左）的对比抗氧化活性。

图8

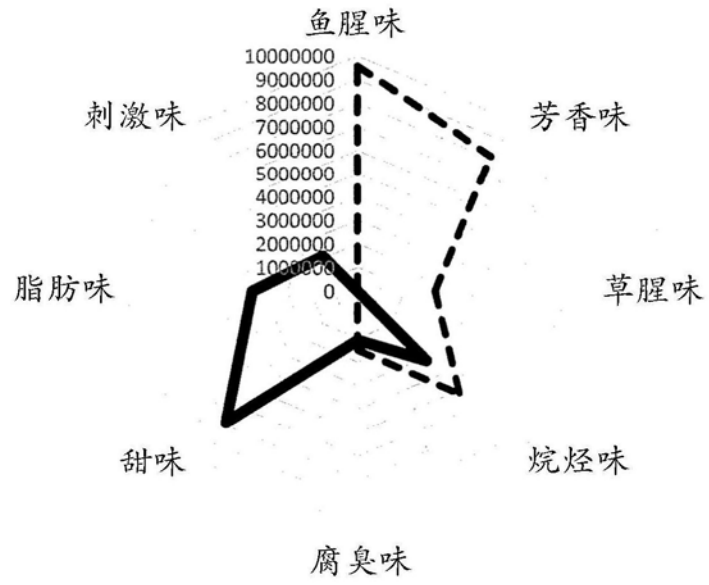


图9 - 通过常规加工方法生产的贻贝组合物 (虚线) 和通过本发明的方法生产的贻贝组合物 (实线) 的典型风味比较。

图9

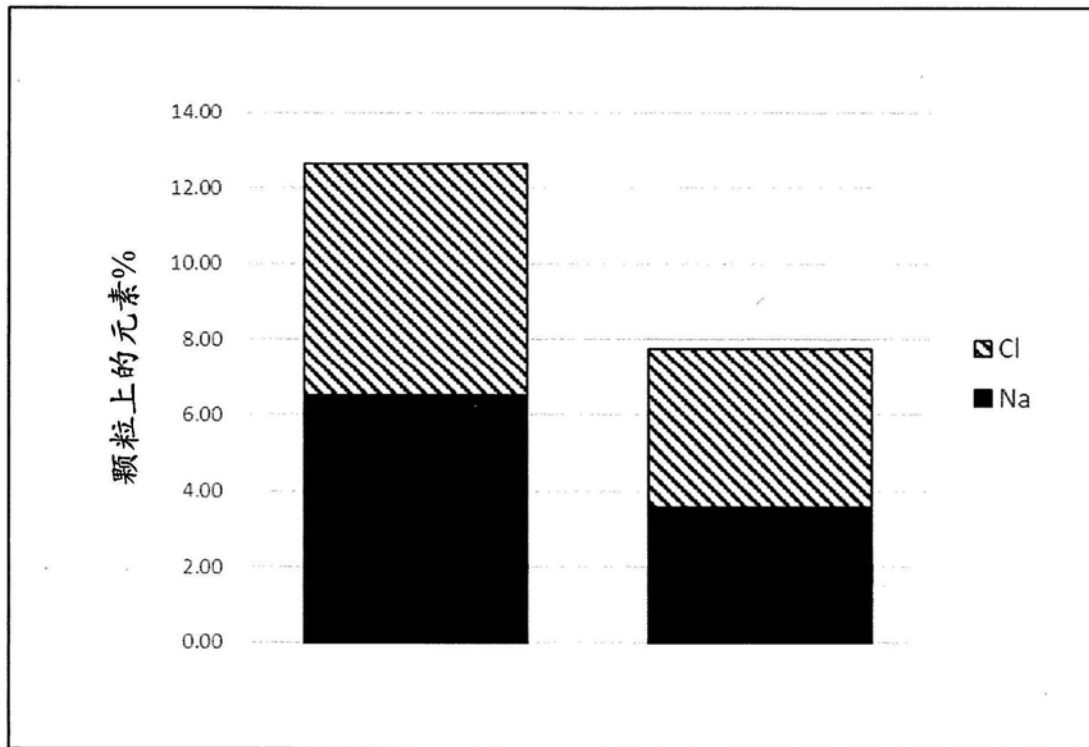


图10 - 通过常规加工方法生产的贻贝组合物 (左条) 和通过本发明的方法生产的贻贝组合物 (右条) 的味道比较 (咸度)。

图10

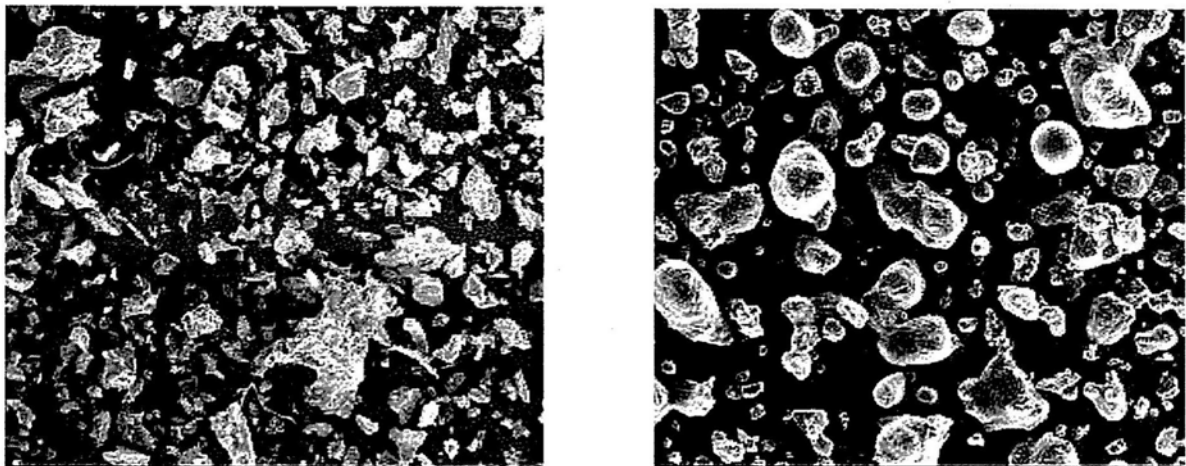


图11 - 通过常规加工方法生产的干燥的整个贻贝组合物 (左) 和通过本发明的方法生产的干燥的整个贻贝组合物 (右) 的扫描电子显微镜图像。

图11

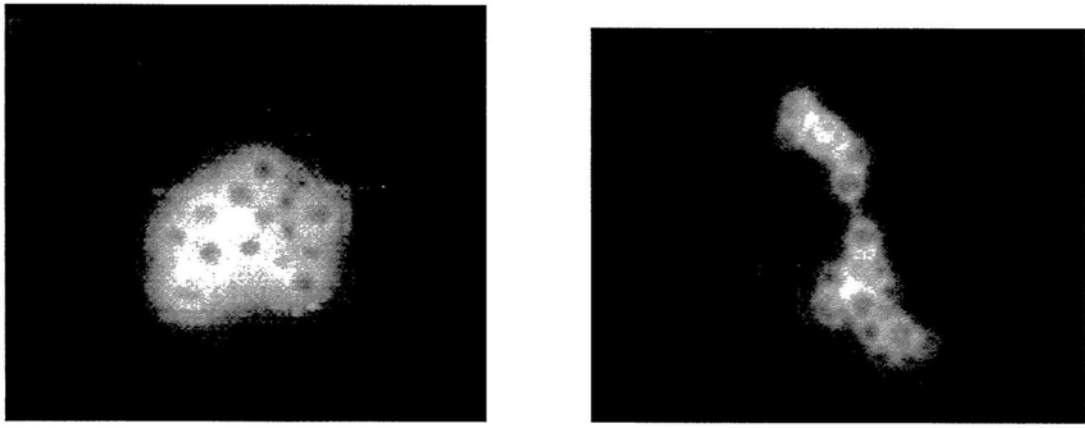


图12 - 通过本发明的方法生产的干燥贻贝组合物在水中再水化时所见的典型乳液组合物结构的扫描电子显微镜图像。

图12

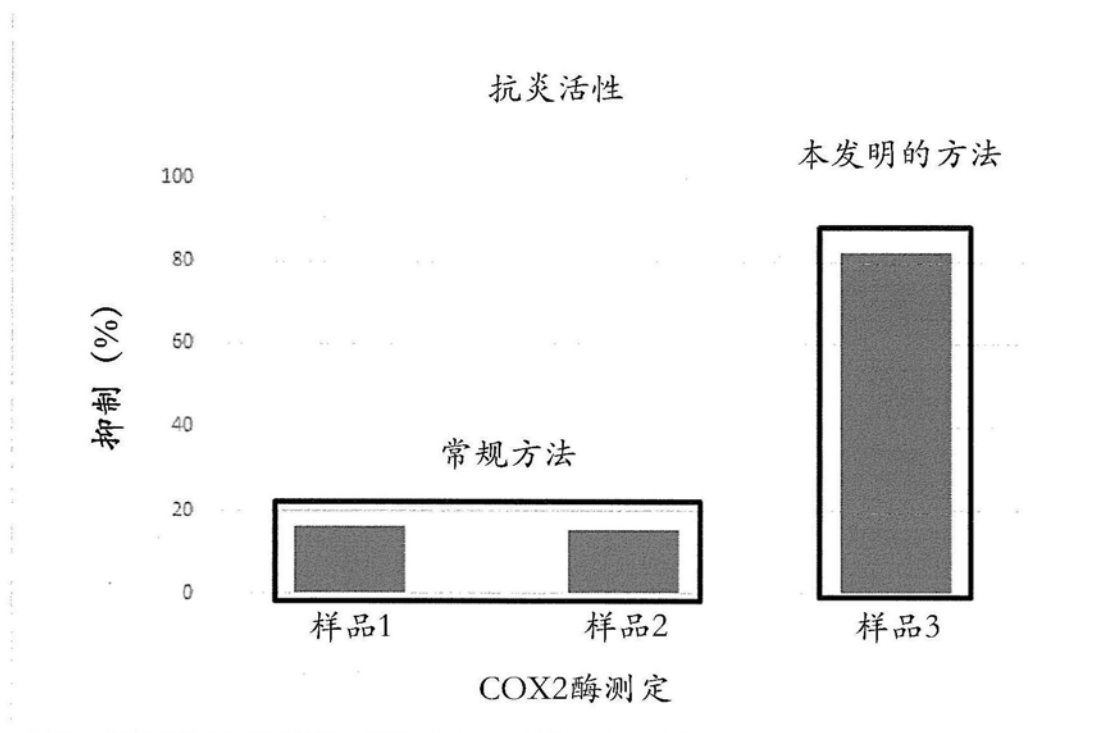


图13 - 根据实例3制备和测试的贻贝组合物的提取物的COX-2抑制活性。

图13

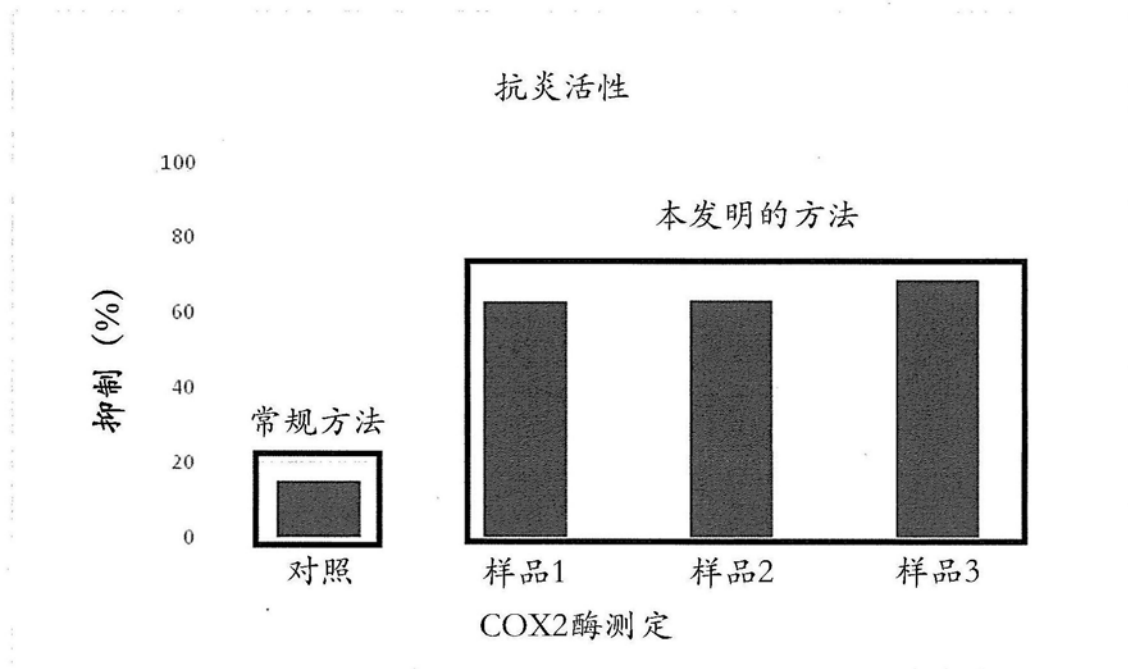


图14 -根据实例8制备和测试的贻贝组合物的提取物的COX-2抑制活性。

图14