

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A23J 3/34

A23J 3/14

A23J 3/18 A23J 3/16

C12P 21/06

[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 96110342.6

[45] 授权公告日 2001 年 9 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 1070344C

[22] 申请日 1996.5.24

[21] 申请号 96110342.6

[30] 优先权

[32] 1995.5.25 [33] US [31] 450421

[73] 专利权人 雀巢制品公司

地址 瑞士沃韦

[72] 发明人 J·麦卡锡 D·V·瓦迪拉

[56] 参考文献

WO9013228A 1990.11.15 A23J3/34

审查员 谢 妍

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 25 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 制备食品水解产物的改进方法

[57] 摘要

一种食物水解产物制品是这样制备的:在灭菌系统中将不含存活嗜温微生物和孢子的蛋白基质用适于水解该基质的灭菌酶制剂进行水解。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种获得食用水解产品的方法，包括：用一种蛋白分解酶制剂水解蛋白物质，得到一种水解物基质；将该水解物基质在足以使嗜温微生物和孢子不存活的温度和时间下加热，得到一种不含存活嗜温微生物和孢子的基质；和在无菌系统中用一种适于水解该基质的无菌酶制剂水解不含存活嗜温微生物和孢子的蛋白基质。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述基质在 0℃ 至 45℃ 的温度下水解。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述基质在 0℃ 至 20℃ 的温度下水解。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述基质在 20℃ 至 40℃ 的温度下水解。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述基质包括肽类，所述酶制剂包括肽链端解酶制剂。

6. 权利要求 5 的方法，进一步包括用一种蛋白分解酶制剂水解蛋白物质以获得所述基质。

7. 权利要求 6 的方法，其中所述蛋白物质包括完整蛋白质。

8. 权利要求 6 的方法，其中所述蛋白物质是玉米，并且该玉米在碱性条件下水解得到所述基质。

9. 权利要求 1 的方法，进一步包括用一种蛋白分解酶制剂处理所述蛋白物质以使该物质的蛋白增溶而获得至少部分增溶的基质，并且用一种酶制剂处理所述增溶的基质，得到所述蛋白基质，使该基质不含存活微生物和孢子。

10. 权利要求 9 的方法，其中所述处理包括将所述增溶的基质

加热一段时间使嗜温微生物不存活和将所述蛋白基质加热使嗜温微生物不存活，得到不含存活微生物和孢子的基质。

11. 权利要求 9 或 10 的方法，其中所述蛋白物质包括小麦面筋，并且该小麦面筋在酸性介质中用酸性蛋白酶处理以得到所述增溶的基质，中和该增溶的基质并用中性蛋白酶处理。

12. 权利要求 9 或 10 的方法，其中所述蛋白物质包括大豆蛋白，并且该大豆蛋白在碱性介质中用一种碱性蛋白酶处理以得到所述增溶的基质，中和该增溶的基质并用中性蛋白酶处理。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述基质用包括链霉蛋白酶制剂和肽链端解酶制剂的两种酶制剂进行水解。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述蛋白物质用链霉蛋白酶制剂进行水解。

制备食品水解产物的改进方法

本发明涉及物质的酶水解，特别是蛋白质物质以及尤其是蛋白质食品物质的酶水解。

近二十五年来，工业领域中，特别是食品工业中使用酶对物质进行水解的兴趣极大增加，因为利用曾长期采用的酸水解时，某些必须的氨基酸完全降解，其余的则部分降解。此外，现已认识到用盐酸水解蛋白质期间会形成副产物，包括已知为氯乙醇之类的物质，即氯丙醇及二醇化合物，它们可能会带来健康方面的担忧。

物质的酶水解操作的基本目的是物质化学键的断裂。通常，水解产物的制备是这样实现的：对方法有效性而言，物质至少是部分可溶的条件下掺入酶制剂和该物质的水悬浮液；该水解产物的制备旨在用其本身作为消费食物产品，如用作营养目的，或香味料之类的其它用途或制备其它产品，或用来获得为这些或其它用途的特殊产品成分或多成分。酶制剂和其它试剂的选择取决于水解物质组成的化学结构和所需水解产品的规格。

已知在巴氏灭菌或消毒牛奶和乳制品中使用无菌乳糖酶制剂分解乳糖，如参照Bijl的加拿大专利CA 1246476，而且据信药品工业中已采用了无菌酶制剂。但通常在水解蛋白质背景中，特别是制备营养和香味食物产品的工业生产中，微生物污染一般不视

为问题，因为水解过程一般在50°-60°C温度范围以及约8-约12 小时进行，因此该条件下细菌生长受到限制， 如Erikson 等人的PCT专利申请公布WO92/11771所指出的。此外，尽管本领域报导蛋白质的酶水解可在低于50°C的温度下进行， 但通常即使在此情况下，也不必担心微生物污染， 因为蛋白质水解产物制品在制备后要加热到至少足以使酶失活的温度和持续时间， 利用温度和时间施行对产品的巴氏灭菌或杀菌是常见的。

但另一方面，值处注意的是从曲(koji)陈酿制备酱油靠高浓度氯化钠来防止微生物污染，但现在认为其对健康不利而且不益于许多酶的活性。亦可使用抑制微生物生长的其它试剂，如Kemmerer US2,180,637建议的那些，及Kikuchi等人 US 3,857,967 使用的那些，但所公开的这些试剂在食品应用中不理想。

与已知的微生物发酵或酸水解方法相比， 由于这些方法中仅能直接控制水解范围或程度，故适应生成产品的效能有限， 而酶水解对任何具体需处理的物质在理论上都能获得较为准确的适合具体规格的各种产品。但即使如贯穿本领域的资料记载那样， 可能在一定程度上是这种情形，通常特别是对投资/利益分析而言， 尽管取决于所用酶的数量， 但酶水解蛋白质获得的所需产品的产率低，而且通常无一例外的规律是这些方法导致大量副产物， 它们极少有用途且没有大的经济价值。

影响所需产品产率的因素是为普通工业用途制造的酶制剂，即本领域已知为工业级酶，一般是多种酶的混合物或“混合品”(“cocktail”)，这些酶在基质亲合性和专一性，后称“活性”，即在任何具体设定的反应条件，包括PH 和温度下引起某一具体基

质化学键断裂的能力方面不同。尽管制剂混合品的一种酶活性一般占主导地位。尽管下述情况为已知，即酶制剂的两种所需活性可由控制PH顺序进行，如Gianna等人的EP0320717公开的内容，但视为“杂质”的该制剂中的其它酶也可发生作用和产生效果，它们与所需的作用和效果竞争或甚至不协调。例如，根据基质和/或水解条件，“杂质”可能会减损理论产率，因为该杂质会引起竞争反应和/或甚至会破坏具有主导活性的酶，从而使反应的抑制超出预料的基于理论考虑的范围。

为增强控制方法和成品专一性，使用基本纯净的酶将是理想的，但随之而来的是由于提纯工序增加了酶制剂的成本，通常用投资/利益比来代表，这在一般工业用途，而不是药品工业，或用于较小规模高价值的分析目的或生物工程中是不合适的。在食品香味料领域尤其如此，特别是当纯化酶的投资/利益与进行常规微生物发酵或酸水解的投资/利益相对比时。

为强调上述值得注意的问题，工业实践中，特别是食品领域中不经常采用较大量的工业级制剂来增加给定制剂的主导酶的活性，这是与任何给定工艺条件所需的理论量相比而言，并且该反应进行约8-约12小时。例如对任何给定条件使用较大量的酶制剂来加快反应速率，而且当蛋白质物质进行中度水解得到水解产物时，按这种方式操作不会遇到麻烦，其中该水解产物具有宽分布的肽且由分子量大于10,000道尔顿的成分组成。

但当需要获得蛋白质水解产物，如一种适于营养用途的水解产物时，它具有高的水解度，因此产物中含大量的游离氨基酸和/或窄区域分布的肽，例如分子量低于约10,000道尔顿和优选低于

约6,000道尔顿,就会出现各种问题。如本技术领域所述,这些产品适于各种食品和营养用途,包括用于牛奶蛋白质过敏的婴儿配方。但除非采用特别的反应物组合和条件,如Jost, US 5, 039, 532, 上述这类产品的产率一般非常低,而且由于使用的酶制剂使这些方法很昂贵。另一方面,为了减少酶用量,所用基质是稀释的,从而可能使方法的经济性不具吸引力,这是源于单位/体积之考虑。

为获得上述高价值的最终利用成品。还已知将酶方法与水解产物分离方法如超滤结合运用。这些方法包括Erikson等人, PCT 专利申请公布WO 92/11771和Nielsen等人, PCT 专利申请公布WO 93/24020描述的那些,以及Maubois等人, US 4,427,658提出的分离析方法,其公开了使用超滤膜反应器,可接连续方式运用,循环和再进行渗透。但Maubois指出酶浓度与蛋白质浓度之比例必须在8%-15%范围。

因此,长期以来一直希望且现在仍然希望在食品工业,特别是水解蛋白质领域一致地获得低分子量和/或窄分布肽的酶水解产物,以及解决如何提高产率而同时减少酶用量以节约成本和得到投资/利益有效性的两个矛盾方面。

本发明提供对易于酶水解的物质,特别是蛋白质物质进行酶水解的方法,它使得在某一温度采用酶制剂能达到最优效果或能控制酶活性以实现高度水解和增强对产品分布控制,且不使用抗菌剂。特别在蛋白质水解情况下,重要的是本发明不仅能取得前述优点,而且能获得低分子量的酶水解产品,其产率至少与现有方法的产率可比,尽管其使用的酶制剂量小于现有技术酶水解方

法中前述常用量。因此与现有技术酶法相比，本发明降低了成本，因为实施酶水解时，酶的利用如果不是唯一的，也是一个主要的加工成本因素。

此外，根据本发明的方法，可控制加工的温度条件来提高酶制剂的活性和/或减低或提高制剂中“杂质”酶的活性。而且本发明能利用酶来制造食品用途的水解产物，而在此之前由于它们的活性温度分布则被认为不适于工业用途。

前述结果是借助这一方法来实现的，其特征在于易于酶水解和不含存活的嗜温微生物孢子的基质，特别是蛋白质基质在无菌系统用适于水解该基质即分裂该基质的无菌酶制剂进行水解。

水解可在任何温度进行，包括嗜温范围，即约20°C-约40°C，和低于嗜温温度，条件是该温度下酶具有活性。为获得借助本发明可行的长期水解的附加效益，水解较有利地是在低于嗜温范围的温度下进行，优选在嗜冷范围，即约0-约20°C进行，更优选在低于17°C下进行。但基质介质不应是非流体，例如冻结的，因此水解较有利地是在约0°C-约45°C温度下进行，尽管不排除更高的温度。

在本说明书和权利要求书的上下文中，术语“蛋白质基质”是指并包括整体蛋白质，即蛋白质本身和肽。

在本发明书和权利要求书的上下文中，术语“酶制剂”是指并包括至少一种稳定形态的酶，如脱水粉状，或溶液或液体悬浮液，通常是水介质，该术语旨在包括如本领域所知的纯化酶以及工业级酶。

在本说明书和权利要求书的上下文中，术语“无菌”酶制剂是指并包括不含存活微生物及其孢子，即真菌、酵母和细菌的酶

制剂，可采用已知和常规的无菌过滤方法获得。无菌酶制剂被认为是不能能够通过具有0.45 μ 孔的膜过滤器的微生物或孢子的制剂。

此外，当微生物和/或孢子存在于酶制剂中但未存活的情况下，术语“无菌”是指制剂已经过以下一个步骤，包括但不限于下述那些步骤，即使微生物及相关的孢子不能存活，发育，繁殖，和/或再生，因此需避免的任何来自制剂的微生物生长不再是上述无菌过滤制剂的情况。

在本发明书和权利要求书的上下文中，术语“灭菌系统”是指并包括适于进行酶水解的设备，包括但不限于下述设备及设备系统，该设备已用多种工序处理，如热，紫外线，或电离辐射或辐照和/或醇洗成其它适于得到无菌设备条件的本领域已知的类似灭菌方法。当然，当根据本发明使用该系统元件加工前，系统元件的无菌条件应保持到已知和能接受的无菌操作和工序可能进行的程度以避免污染。

尽管根据本发明可处理任何已知的可以酶水解的物质，但蛋白质物质的处理有利于制备食品。正如下面将进一步说明，本发明特别有利于处理植物蛋白质物质，特别能用来处理小麦面筋，这里包括重要的谷蛋白，大豆蛋白和玉米蛋白及其衍生的肽。在本发明的一个特别优选的实施方案中，这类蛋白质物质的共同处理是最后的水解步骤或阶段，即按上述方法进行，它利用适于使肽断裂的无菌酶制剂，该所选的酶制剂取决于所需成品的规格。例如为获得含大量游离氨基酸的产品，具体使用一种肽链端解酶，即氨肽酶或羧肽酶，为获得高产率的各氨酸或谷氨酰胺，则使用

谷氨酰胺酶。

因此，水解蛋白物质的本发明优选的实施方案最有利的是按多步进行，而上述本发明最有利的是作为最后一步采用。通常在这种情况下，处理由蛋白分解水解蛋白物质悬浮液得到的水解产物使得在水解产物中含有的嗜温微生物和孢子以不存活形式出现，致使微生物和孢子不存活一般是通过在足以让该水解产物不含存活微生物和孢子的温度和保持时间下对水解产物加热来有效地完成的。然后加热后的水解产物按照能保持其无菌性的方式进行冷却，冷却后的基质再如上述用无菌酶制剂在无菌系统中水解。

如上所述，当处理蛋白质原料时，本发明的优点可通过进行一步或多步酶水解来实现。根据本发明，当进行多个阶段时，可按照上述无菌水解方法进行一个或多个步骤。但正如指出的那样，通常发现按照本发明无菌水解方法的水解最有利的是在多水解步骤的最后步骤进行。

例如，当用完整蛋白质作起始物时，为使酶水解有效地进行，本领域的技术人员知道，蛋白物质优选首先部分溶解，这有助于在水介质中形成该物质的悬浊液，还应知道根据提供反应基质的物质组成，该蛋白物质的部分增溶可借助单独选择PH条件来实现。例如玉米和玉米蛋白质及类似组成的物质在PH约8-约9时可充分溶解以促进水解。另一方面，至少部分增溶可借助在一特殊PH下的蛋白分解工序来实现，小麦面筋及类似组成的物质用该工序可最好地增溶。

因此，本发明包括多种方法，其中在无菌水解工序之前，蛋白物质用蛋白分解酶制剂水解以获得在无菌工序中处理的基质。

此外在进行无菌工序前，蛋白质物质可用蛋白分解酶制剂处理以使该物质的蛋白质增溶从而获得至少部分增溶的基质，然后该增溶的基质用蛋白分解酶制剂处理以获得在无菌工序中处理的蛋白质，可以进行以下这种处理而使提供的基质不含存活微生物和孢子，这里定义的这种处理包括如下所述的热处理实施。

此外，可能需要根据前述PCT 申请中陈述的方法或根据Melachouris等人的欧洲专利申请出版0087247 所述的方法对基质预处理。在任何情况下，当本发明用作最后水解阶段时，欲如此水解的基质，即水解产物进行处理以便该基质中的嗜温微生物和孢子以不存活形式出现，然后该基质如上所述用酶制剂进行水解。

特别在根据本发明水解之前和/或多步工序之前和/或多步工序的阶段之间，发现加热蛋白基质有利于蛋白质变性，借此展开蛋白质/肽结构并使该基质更易于受酶攻击和断裂。同样，在阶段之间可改变PH条件以适应连续阶段中不同酶制剂的特性和/或该基质的性质。应了解按下述进一步讨论方式进行热操作来提供不含存活微生物和孢子的基质也会产生变性。

根据本发明采用的酶制剂借助从该制剂去除微生物和孢子或借助使酶经受让微生物和孢子不存活的工序可实现基本上无菌，但不会影响酶制剂的存活和活性。获得无菌酶的优选方法是酶制剂溶液进行无菌过滤，以及本领域已知的膜过滤，实现此方法的有用系统是UNIFIO注射过滤器，可从Schleicher and Schuell, Inc, Keene, New Hampshire U. S. A. 得到。有用的系统还有PROFLUX M12切向过滤系统，可从 Amicon, Inc. , Beverly, Massachusetts, U. S. A. 得到。

如上所述， 无菌酶制剂是不含存活微生物和孢子且它们不能通过0.45 μ 孔过滤器的酶制剂， 但可采用小孔过滤， 可能优选作为安全网以去除能通过0.22 μ 孔的膜， 即过滤器的微生物和孢子。

此外， 无菌酶制剂可通过辐照酶制剂而获得， 如民主德国专利文献DD237078A3描述的电离辐射， 或通过本领域已知的丙酮或醇沉淀方法而获得。 另一方面， 应能得到无菌酶制剂， 如粉末状的， 如果该制剂需要在水中稀释， 则必须使用无菌水。

在所有情况下， 于获得酶制剂之后， 应当按照良好无菌操作进行处理以适于本发明的用途。

当进行多步水解时， 对于提供要根据本发明水解的基质不含存活的嗜温微生物和孢子而言， 发现可有参照物来确定是否先前的加工已导致孢子达到生长阶段， 这主要取决于所用的温度条件， 例如， 如果采用三步水解方法， 则可在足以单独使存活微生物不存活的温度和持续时间下仅对第一水解产物即增溶基质加热， 即只杀死微生物。 这种情况下， 尽管某些孢子以不存活形式出现， 但基余孢子将导致所谓的生长阶段。 然后条件在有利于孢子再生和转变成存活微生物并生长的温度下保持一般时间， 即达到约2小时左右， 然后在足以使微生物不存活的温度和时间下加热该基质， 该多步方法由此有效地提供了不含存活微生物和孢子的基质。

从实践角度考虑， 三步水解方法中允许在第二水解步骤期间进行生长阶段， 在此水解步之后， 对水解产物加热使微生物不存活， 从而提供适于使用无菌酶制剂的方法进行加工的基质必要特征。 因此， 通常在该方法中， 可采用足以使酶失活的时间和/或常规巴氏灭菌方法使用的温度。 故采用的温度一般至少约80°C。 但

作为安全系统，一般采用至少约90°C 并保持足以使微生物不存活的时间，即约5分钟-约30分钟， 优选最有利的温度是约90°C- 约110°C。

失活/巴氏灭菌加热可分批进行，优选使用搅拌或其它搅动，注入蒸汽，或夹套罐或适宜的平板型热交换器， 可有或没有蒸汽注入，或在管中连续地，优选使用蒸汽注入和静混合元件。

另一方面，为获得不含存活微生物和孢子的基质，该基质，例如水解产物可在悬浮液中分批或连续地加热，其温度至少约121°C，压力15psi (即超过约1bar)，至少约15 分钟及与技术可接受的高温或超高温/短时灭菌方法一致。如上所述，当欲按本发明处理的基质未经诱发生长阶段的条件时，一定要进行上面的工序。灭菌可按上述方法进行并与失活/巴氏灭菌方法联合运用，但一般最有利的是在含静混合元件的管中的连续方式采用蒸汽来进行。

可用于本发明处理的蛋白物质包括任何食用蛋白物质，特别是食品可接受的物质。除上述提到的具体物质外， 这类蛋白物质包括肉(包括动物，家禽和鱼肉)及骨，胶原， 蛋清和蛋黄蛋白以及其它磷蛋白和含蛋白的抽提物，还包括动物蛋白制品的衍生物，如明胶。这类物质还包括乳品物质， 包括但不限于小麦蛋白和酪蛋白，包括上面没提及的其它含蛋白的植物物质，如含蛋白的油籽，以及大豆，包括脱脂大豆，以及大米蛋白和昆诺阿藜 (quinoa)。该蛋白物质亦可包括载有蛋白的物质和从包括酵母细胞等微生物获得的抽提液。

所用的酶制剂取决于其组成和活性， 它按照所需成品规格来选择。该酶制剂可以是天然的，即从天然存在的微生物中分离的，

或从基因改性微生物(“GMO”)分离的,即已经克隆和/或过表达(over-express)的基因产品分离的,或者是经突变基因产生的酶。亦可采用经化学改性的酶,如固定化或固相包括涂覆在小珠(bead)上或生物蛋白上或用PEG或果胶处理。

尽管使用工业级酶在成本上最有效,特别是在寻求最大程度控制成品规格的情况下,可采用一种高纯度的酶,因为与获得相似效果的常规用量相比,本发明所用的酶量较小,相似效果例如为相似的水解度和产品产率,迄今被认为不具成本有效性的纯化酶和其它酶可在此具有成本/效益有效性的用途。

特别是在工业级酶的情况下,如上所述,对酶的选择是基于考虑在酶制剂中包含的“杂质”的活性即不是具主导活性专一酶的活性。如上所述在这一点上可发现:可加以控制温度条件以增强该制剂中所需主导酶的活性和/或减弱或增强那些“杂质”的活性,这在本领域中迄今从未提及过。此外,特别当在本发明上述优选温度条件下进行操作时,嗜冷温度范围内的酶活性也找到特殊的适用性。

在处理蛋白质的情况下,任何蛋白分解酶制剂都可使用,参考材料可用Webb, ENZYME NOMENCLATURE, NC-IUBMB, ACADEMIC PRESS, Inc., 1992, 它提供酶的编辑资料和其用途以及基质断裂指示。任何酸性、中性、或碱性蛋白酶都可选择,这取决于基质特征和所需工艺条件。

例如,蛋白分解酶通常取自动物和植物源,特别是微生物源,如泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*),黑曲霉(*Aspergillus niger*),米曲霉(*Aspergillus oryzae*),酱油曲霉(*Aspergillus sogae*),

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*), 毛霉菌种(*Mucor sp.*)或米根霉(*Rhizopus oryzae*)。 这些酶包括本文确认的前述文献中公开的酶和US 3,914, 346中公开的酶, 其说明书在此引作参考。但是, 尽管胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶在工业领域中用来制造食品被认为太昂贵, 但它们能有效地运用, 在某些情况下具有分解脂肪和分解蛋白活性的胰酶也可有效采用。

但特别是出于费用的原因, 当在酸性条件加工时, 可有效地采用酸性蛋白酶, 如从 QUEST International of Sarasota, Florida, U. S. A. 获得的名为BIOCON酸性蛋白酶或酸性蛋白酶L制剂。当在中性条件加工时, 可有效地采用中性蛋白酶, 如从 Amano International Enzyme Co., Inc. of Troy, Virginia U. S. A. 获得的PROTEASE 2A; 当在碱性条件下加工时, 可有效地采用从Novo Nordisk A/S of Bagsvaerd, Denmark获得的ALKALASE2. 4L制剂。

为获得含大量游离氨基酸的产品, 可采用各种肽链端解酶制剂。可有效采用的氨肽酶, 如US 3,914,436中描述的酶, 其说明书在此引作参考, 尽管这要取决于所需结果, 但可从 ENZYME NOMENCLATURE 中确认的那些酶中进行选择。特别有效的氨肽酶制剂包括从Amano得到的PEPTIDASE A AMANO制剂, 将会提到它也具有肽链内断酶活性。可有效地采用COROLASE 酶制剂, 它由 Rohm Tech, Inc. of Malden MA, U. S. A. 提供, 具有肽链端解酶活性或肽链内断酶活性。将会发现COROLASE PP具有羧肽酶B活性。可有效采用的还有Novo 的 FLAVOURZYME酶制剂, 它具有羧肽酶活性。亦发现从BIOCATALYSTS LTD, Pontypield, Wales, U. K. 得到的

PROMOD肽酶可有效地用来水解大豆蛋白。

还将知道亦可使用在ENZYME NOMENCLATURE中确认的羧肽酶制剂。

为获得含大量谷氨酸和/或谷氨酰胺，可采用上述Kikuchi 1967专利描述的“PGase”酶，而且也可使用在ENZYME NOMENCLATURE中确认的这些酶。

尽管本领域中的教导着眼于酶和酶制剂的活性单位量，即单位/g，如Anson单位/制造商的单位，对此，不进行试验一般很难互相关联(cross-correlation)，这在实现本发明构思范畴中不是临界变量或没有特别的意义。当然，应考虑制造商的活性指示、用量及说明书。

此外，根据本发明的方法进行操作减少了所用酶的总量，与根据现行引方法进行操作预期的水解度相比，取得了相同的且通常是更大的水解度。例如，酶的用量一般比酶厂商普通推荐量和/或任何具体应用中的用量要少达50%。下面还将例举，以基质干重计采用1wt%或更小的酶量，便可获得所需效果和高产率。

本发明的水解方法可分批进行，只要是本领域常规技术，或按上述Jost专利所述的方法进行。也可采用连续超滤膜反应器，及有效地采用循环管反应器，包括Oosterhuis等人的US 5, 073, 496 所述的反应器。可按 Baensch 等人的欧洲专利申请公布 EP0566877所述的方式进行连续操作。亦可考虑固定酶反应器。在这点上将知道，不同的设备和加工构型一般会影响反应动力学和反应抑制极限等，因为操作模式的不同，反应物和反应产物之间的比率，超限时间之类不同。

因此，从Jost的说明书进一步会了解，特别是水解乳蛋白，尤其是水解乳清蛋白至少应分两步进行：热变性步骤和用胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和胰酶及ALKALASE制剂之类的酶解步骤。但根据本发明，为获得成品规格，最后水解步骤在灭菌系统用无菌酶和不含存活嗜温微生物及孢子的水解产物进行。

当进行多步方法时，根据本发明进行酶水解工序之前，实现增溶和/或蛋白分解所用的加工条件可包括本领域已知的足以使增溶和/或水解反应速率以及产品产率达到最佳的各种条件。但通常在采用本发明方法之前蛋白分解工序所用的加工温度条件理想的是高于嗜温范围，这有助于引起孢子的生长，该温度如本领域常规温度一样优选大于50°C以抑制微生物的生长。

如上所述，本发明方法在低于嗜温范围的温度下，优选低于约17°C下可有利地进行，这进一步减少了不希望有的微生物的潜在污染。尽管对许多酶而言该温度可低于最佳范围，从而降低反应速率，但反应要在较长时间内完成，是以天计而不是以小时计，是反应进行到超过反应速率开始降低的那时。如上所述，以基质重量计，优选使用的酶量为1%或更少。

基于已按照本发明进行了所需时间的水解，假定不采用膜反应器，则可将全部水解产物加热，即将水解后基质的上清液和固体(固体在这里是指“成粒基质”)加热到至少使酶失活的温度和时间，或足以获得巴氏灭菌或无菌产品的温度和时间。在后一情况下，如果需要，产品可进行无菌包装。另一方面，上清液可从成粒基质中分离出并如此处理，如果采用膜反应器按连续方式进行可能是这种情况。但通常上清液从成粒基质中的分离是用过滤

完成的，优选用离心分离，通常它能提供较高的上清液产率，或者过滤与离心分离联合运用。

另外，酶已失活的上清液和成粒基质一起，或者从成粒基质分离出的上清液可如此使用，或者该上清液可用真空蒸发之类进行浓缩，和/或用本领域已知的各种干燥方法进行干燥，特别是包括喷雾干燥或冻干。另外，上清液可进行超滤或其它分离/分馏技术处理得到产品馏分。

此外，产品产率可借助以下处理进一步提高：用相同的酶制剂或不相同的酶制剂处理已分离掉上清液的成粒基质。在此发现成粒基质即使经过离心分离之后仍不能保持小量的水解产物。该产物经压榨或抽提可从成粒基质中除去。还发现该水解产物的特征和组成不同于先前除去的上清液的特征和组成。而且剩余的成粒基质可进一步水解。

再者值得注意的是本发明方法可这样进行：在不同时间点按一步或多步顺序加入酶，使产品制造和/或产率增加。例如，在某一段时间内利用一种酶或几种酶获得主要是二肽、三肽和/或多肽的产品，然后可加入具有特殊活性的酶制剂使肽裂解，同时将反应平衡转移至提高二肽、三肽和/或多肽产物的生产量。说明的是：利用第一种酶制剂获得谷氨酰胺，接着在反应进行的同时，引入适于将谷氨酰胺裂解的酶制剂而得到的谷氨酸，类似地，X-脯氨酰二肽酶(pro-x)和x-pro二肽酶可有效地用来获得脯氨酸。

此外，链霉蛋白酶，从链霉菌属griseus (Streptomyces griseus)分泌的胞外蛋白可用于本发明，特别是有效地用来获得大量游离氨基酸，可单独使用，或其它酶联合使用或顺序使用。

同样，微生物胶原酶，梭菌肽酶A可单独使用或与其它适用于水解胶原蛋白的酶制剂一起使用。

如上所述，本发明特别适用于多步方法水解小麦面筋、大豆蛋白和玉米蛋白，在本发明最后一步中利用肽链端解酶，特别是氨肽酶，从而获得高水解度。特别是从下述一些实施方案可发现：水解上清液中和成粒基质中的游离氨基酸和分子量小于约2,000道尔顿的肽(即链长达20个氨基酸)的产率至少约为65%，一般是约65%-至少约80%。上清液中游离氨基酸的量为约40%-约60%。

在以下论述中，碱性条件的参考情况是指并包括PH是约7.5及7.5以上的介质，特别是PH是约8-12，更特别的是约8.5-11。中性条件是指并包括PH是约6.5-约7.5的介质，酸性条件是指并包括PH小于约6.5的介质，特别是PH是约2-约6.5，更特别是约3-4的介质。

根据本发明可直接获得前述效果，在玉米蛋白基质的情况下，玉米蛋白在碱性条件下至少部分增溶使其处于适合被蛋白分解酶进攻的条件。第一水解步骤在碱性条件下用碱性条件下的活性蛋白酶完成，该步骤前可用热变性步骤。ALKALASE 2.4L酶制剂可有效地使用，反应进行一定时间从而让该反应趋于抑制，即达到反应速率降低时，但不排除更长的时间。

第一水解步骤后，蛋白分解了的玉米基质加热至足以使嗜温微生物和孢子不存活的温度和时间。由于用这种方式加工玉米蛋白只需二步水解工序就可获得理想的效果，因此基质应在至少约15psi(约1bar)压力和至少约121°C温度下保持至少约15分钟进行加热。加热过的水解产物再进行冷却并根据本发明如上所述在无菌系统中用无菌酶制剂处理以水解肽，优选肽链端解酶以及优

选保持的时间范围是至少直到水解速率开始下降。 PEPTIDASE A AMANO制剂可有效地使用。

在小麦蛋白，特别是面筋的情况下，进行三步水解方法。蛋白放置于酸性介质，即酸化水中，首先用酸性蛋白酶处理使完整蛋白至少部分增溶并开始水解，该反应可进行至反应速率开始降低，但并不排除更长的时间。BIOCON 酸性蛋白酶制剂可有效地使用。中和该反应介质并加热使酶制剂失活和使嗜温微生物不存活，如在约100°C-110°C加热至少约5分钟，但通常优选至少约10分钟。

该基质冷却后用中性蛋白酶处理水解肽和完整蛋白以获得第二水解产物，此反应亦可进行至反应速率开始降低，但并不排除更长的时间。PROTEASE 2A 制剂可有效地使用。进行第二水解步骤会引起孢子生长，因此基质介质只需用热处理而使酶制剂失活以及使嗜温微生物不存活，诸如按上述方式进行。但并不排除使用灭菌方法。

第二水解产物冷却后，根据本发明如上所述在无菌系统用无菌酶制剂处理以水解肽，优选用肽链端解酶，优选保持的时间范围是至少直到水解速率开始下降，但不排除更长的时间。且 PEPTIDASE A AMANO制剂可有效地使用。

在大豆蛋白的情况下亦采用三步水解法。该蛋白悬浮于碱性条件的水中并在碱性介质中用碱性蛋白酶处理以进一步使蛋白质增溶和促进水解，该反应可进行至反应速率开始下降，但不排除更长的时间。ALKALASE 2.4L制剂可有效地使用，在终止第一水解步之前，发现将PH减小至中性范围是有效的，但这并不被视为必须。

如果第一步大豆水解产物的反应介质没有预先中和，则可进行中和，然后加热使酶制剂失活以及使嗜温微生物不存活，如在约100°C-110°C加热至少约5分钟，但通常至少约10分钟。

第一水解产物冷却后在中性条件下用中性蛋白酶处理以水解肽和任何完整蛋白，该反应可进行至反应速率下降，但不排除更长的时间，且PROTEASE 2A制剂可有效地使用。进行第二水解步骤会引起孢子生长阶段，因此基质介质只需用热处理而使酶制剂失活以及使嗜温微生物不存活，诸如按上述方式进行。但并不排除使用灭菌方法。

第二水解产物冷却后，根据本发明如上所述的无菌系统用无菌酶制剂处理以水解肽，优选用肽链端解酶，优选保持的时间范围是至少直到水解速率开始下降，且PEPTIDASE A AMANO制剂可有效地进行。

从上述可知道：任何已知的水解产物制品可根据本发明进行操作生产，且可用于各种已知方式中。因此，这些产品和用途包括营养制品和用途，包括低变态产品，如婴儿食品，或特制为某一特殊用途的产品，包括需要一种或多种游离氨基酸，或小肽，即2-5个氨基酸的人类治疗品，或用于进一步加工成其它产品。特别是含大量游离氨基酸，和/或其馏分的水解产物本身可有效地用作香味料，或用作其它产品的前体，特别包括是由美拉德反应或其它香味料制备反应的制造香味料的前体。

实施例

下列实施例用来进一步阐述本发明，除非另外指明，百分比

都是以重量或体积/体积计。

试验方法

产品中的总氨基酸是用盐酸水解冻干产品后再用高压液相色谱(HPLC)方法测定的。样品和6M HCl引入到Pierce 水解管中并混合, 为方便地将样品放置于真空中, 管中容纳的样品被冻结, 施用真空以在管中形成真空并将管密封。真空中的样品在约110°C下加热约24小时以完成水解, 该水解产物冷却后进行真空干燥, 干燥样品悬浮于Pickering稀释缓冲液2.2中。该Pickering缓冲液样品进行微型离心分离, 上清液经30,000MW 的断流膜(Cut off membrancc)超滤。等分试样装入Pickering 氨基酸分析柱上, 它与VARIAN 5500 HPLC系统一起适用。氨基酸按PH梯度洗脱, 用茚三酮经后柱应之后进行检测, 该反应在Pickering 装置中完成。

产品中游离氨基酸的量是这样确定的: 如上所述将样品悬浮于Pickering稀缓冲液2.2中, 离心分离、过滤和分析。

细胞计数是这样进行的: 在每升含8.5g NaCl和1g胨的无菌回收水稀释剂中将样品进行十倍系列稀释。0.1ml稀释样品的等分试样涂覆在DIFCO平板计数琼脂(PCA)平板上。该平板在37°C 恒温培养约2天, 进行菌落计数。

实施例1

用去离子水制备的约2l 0.19% 正磷酸溶液在烧瓶中加热至约75°C, 向该酸溶液中加入200g小麦面筋, 该混合物在WARING 混合器中高速混合使面筋呈悬浮液。混合停止前, 向该酸化悬浮液中加入0.5g酸性蛋白酶(BIOCON 200,000BU/g) 得到在该基质中的制

剂量约为0.25%，以面筋基质计，该悬浮液的PH是约3.5。

酸化面筋/酶混事物放入烧瓶中，该烧瓶加有盖并放在振动恒温箱中。烧瓶及内容物充分振动以保持面筋/酶混合物呈悬浮状，在约60°C加热约16小时，该恒温操作使完整蛋白部分增溶和开始水解反应，提供反应合物基质(水解产物I)。保温后从水解产物I中取出样品进行细胞计数，其表明微生物细胞数小于300CFU/ml。

2.5MNaOH加入到水解产物I基质中并与之混合，其加入量足以使混合物的PH升至约6.2。盖上烧瓶并放入高压釜中于约104°C加热约5分钟，该操作使酶制剂失活，使嗜温微生物不存活，也由此使肽变性。烧瓶和加热的水解产物I冷却至约50°C。

而该冷却的水解产物I中加入1g PROTEASE 2A 制剂 (> 20,000Amano单位/g) 以提供制剂的量为约0.5%，以最初使用的面筋计。盖上烧瓶并放入振动恒温箱中，水解产物I/酶悬浮液加热至约50°C的温度保持约7小时，充分振动保持混合物呈悬浮液，得到第二水解产物(水解产物II)，它导致形成微生物的孢子生长阶段。取样作细胞计数，其表明细胞数小于 2×10^3 CFU/ml。

将容有水解产物II的烧瓶盖上并放入高压釜中约104°C加热约10分钟，该操作使蛋白酶失活，肽变性(以及任何残余的完整蛋白变性)以及使嗜温微生物不存活。加盖的烧瓶和加热的水解产物II再冷却至室温(-22.5°C)。

2g PEPTIDASE A AMANO 制剂(>100,000氨肽酶Amano单位/g)悬浮于装在无菌烧杯中的15ml灭菌水中。该悬浮液经0.45 μ 膜过滤器无菌过滤成冷的水解产物II，提供的酶制剂浓度是约1%，以最初使用的面筋计，将烧瓶盖住。

氨肽酶/水解产物II反应混合物在加盖烧瓶中冷至约14°C温度, 得到进一步的水解产物(水解产物III), 该混合物在约14°C保持约7天, 其中至少每天摇动烧瓶以悬浮分离的固体。取样作细胞计数, 其表明细胞数是0 CFU/ml, 即没有可检测到的微生物生长。水解产物III在约104°C加热约5分钟使酶失活。

水解产物III按约5,000rpm离心分离约5分钟, 得到上清液和成粒基质。

上清液冷冻干燥得到122g冻干材料。

从冻干材料中取样。氨基酸分析表明该材料含约64.3%总氨基酸, 约39.8%的总氨基酸是游离氨基酸。

对比例A

21 0.425%正磷酸溶液按实施例1加热, 向其中加入200g 小麦面筋并与该溶液混合, 亦按实施例1方法。如实施例1一样向该酸化小麦面筋悬浮液中加入4g酸性蛋白酶(BIOCON 200, 000BU/g), 以提供该制剂的量对面筋基质而言是约2%。酸化面筋/酶混合物如实施例1一样进行振动和恒温处理, 不同之处是在约65°C加热且仅保持约5.5小时。该方法终止时提供反应混合物基质(水解产物IA), 取样作细胞计数, 其表明细胞数小于300CFU/ml。

水解产物IA的PH用2.5M NaOH上升至约6.3, 然后按实施例1使水解产物IA在高压釜中加热约5分钟, 再冷至约45°C。

向冷却的水解产物IA中加入4g PEPTIDASE A AMANO 制剂(>100,000 Amano单位/g), 提供的酶制剂浓度是约2%, 以最初使用的面筋计。氨肽酶/水解产物IA反应混合物在约45°C 恒温保持约6

小时得到进一步的水解产物(水解产物IIA)。取样作细胞计数,其表明细胞数是约7,500CFU/ml,说明微生物在生长而且从反应时间考虑,这说明微生物每1小时增加约1倍。

按实施例1,水解产物IIA离心分离,上清液冻干。氨基酸测定表明冻干材料含约68.1%的总氨基酸,约26.6%的总氨基酸是游离氨基酸。

对比例B

根据对比例A的方法进行实验,不同之处是每一蛋白酶和氨肽酶水解反应所用的酶制剂量为1%,酸性蛋白分解进行约14小时,第一水解产物加热10分钟,氨肽酶水解在45°C和PH7.3下进行约5½小时,然后在60°C进行1小时。

冷干材料含约62.7%的总氨基酸,约24.2%的总氨基酸是游离氨基酸。酸性蛋白分解后的细胞计数小于10CFU/ml,氨肽酶水解后的细胞计数小于15CFU/ml。

实施例II

200g玉米蛋白加入到装在烧瓶中的温度约75°C的约21 去离子水中。2.5M NaOH经一段时间加入到水和玉米蛋白中,同时用恒温箱振荡器摇振烧瓶及内容物以使组分混合和蛋白质悬浮,逐渐调节该混合物的PH值至8.5。混合期间蛋白质部分增溶,在停止混合前向该玉米蛋白基质悬浮液中加入3ml ALKALASE 2.4L制剂并与之混合,得到制剂的浓度为约1.5%,以玉米蛋白计。

为获得第一水解产物(水解产物I),将烧瓶盖住并充分摇振基

质/酶悬浮液约7小时以保持玉米蛋白/酶混合物悬浮，同时在约55°C加热。反应前6小时周期性地加入2.5M NaOH保持其PH约为8，在第7小时期间让PH下降。取样作细胞计数，其表明微生物细胞数低于1,000CFU/ml。

加盖的烧瓶和水解产物I在高压灭菌器中于约121°C和约15 psi下加热约15分钟，然后冷却至室温(-22.5°C)。

2g PEPTIDASE A AMANO 制剂(>100,000氨肽酶Amano单位/g)悬浮于15ml水中并经0.45 μ 膜过滤器无菌过滤至冷却的水解产物I中，得到的酶制剂浓度为约1%，以最初使用的玉米蛋白计，再将烧瓶盖住。

为获得第二水解产物(水解产物II)，氨肽酶/水解产物I 反应混合物如实施例1一样在振动下进行冷却并在约14°C保持约6 天。然后取样作细胞计数，其表明为0CFU/ml。

水解产物II于5,000rpm下离心分离约5分钟得到上清液和成粒基质。上清液冻干得到161g产品。

冷干材料含约43.9%的总氨基酸和约48% 的总氨基酸是游离氨基酸。

实施例III

实验按实施例1的方法进行实验，不同之处是水解产物II与氨肽酶的恒温培养温度如下表所示， 在不同时间取样测定上清液的游离氨基酸含量百分比，亦示于表中，破折号表示样品没有分析。

时间(小时)	温度		
	40°C	29°C	17°C
	游离氨基酸%		
0	17.25	17.25	17.25
5	26.7	25.6	--
9	28.8	25.9	--
12	32.3	31.6	--
27.5	34.7	37	23.3
54	41.9	45	30
96	--	--	35.4
168	--	--	42.9

实施例IV

200大豆粗粉加入到烧瓶中的200ml水中，并在平台摇动器上于约60°C搅动约30分钟使该粗粉悬浮，向该悬浮液中加入足够量的2.5M NaOH调节其PH值至8左右。向该调节过PH的悬浮液中加入3.5ml ALKALASE 2.4L制剂并于60°C加热8小时左右，得到第一水解产物(水解产物I)。

向该水解产物I中加入磷酸，其量为足以将其PH调节至约6.5，然后，调节过PH的水解产物I在高压灭菌器中于约104°C加热约5分钟，冷却。

1g PROTEASE 2A制剂(>20,000 Amano单位/g; 0.5%酶)加入到冷却的水解产物I中，在恒温摇动器中于50°C恒温培养约5小时得到

第二水解产物(水解产物II)。水解产物II在高压灭菌器中于121°C和约15psi的压力下加热15分钟再冷却。

按以上实施例提供无菌的2g PEPTIDASE A AMANO制剂(> 100,000 Amano单位/g), 该无菌酶制剂加入到冷却的水解产物II中, 相对于最初加入的大豆粗粉而言, 提供的制剂浓度是约1%。水解产物II和制剂的温度降低至约16°C, 用恒温摇动器恒温培养约4天得到进一步的水解产物(水解产物III)。

如以上实施例一样, 将水解产物III加热使酶制剂失活, 冷却并离心分离。上清液冻干得到83g冻干材料, 它含约45% 游离氨基酸, 以总氨基酸百分比计。

从前述内容可清楚地知道: 本发明的各种改进可在不违背本说明书的实质和范围内进行, 本发明包括以下情况和/或在此情况下可适宜地实现: 缺少和/或排除方法步骤和/或操作, 条件, 物质和/或操作的成分和或这里没有特别指出的限制。