

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-503666

(P2004-503666A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C08B 37/06	C08B 37/06	4B017
A23L 2/52	A61K 7/00	4B064
A23L 2/62	A61K 47/36	4C076
A61K 7/00	A61K 47/42	4C083
A61K 47/36	C12P 19/04	4C090
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-510704 (P2002-510704)	(71) 出願人	501042101
(86) (22) 出願日	平成13年6月8日 (2001.6.8)		シーピー・ケルコ・エイピーエス
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月9日 (2002.12.9)		アメリカ合衆国デラウェア州19894ー
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/018555		0001, ウィルミントン, ノース・マー
(87) 国際公開番号	W02001/096590		ケット・ストリート 1313
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	09/589, 887		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成12年6月9日 (2000.6.9)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脱エステルペクチン、そのようなペクチンを製造する方法および同ペクチンを含む安定化酸性液体系

(57) 【要約】

擬似塑性を示し、かつ少なくとも1つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さない酵素ブロック脱エステルペクチン、および同ペクチンを製造する方法。単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製される酵素ブロック脱エステルペクチン。単離メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製される酵素ブロック脱エステルペクチンを用いて粒子を懸濁させる方法。単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製される酵素ブロック脱エステルペクチンを含む組成物および安定化水性系。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

擬似塑性を示し、かつ少なくとも 1 つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さない酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 2】

多価イオンの量が約 10 ~ 約 2,000 ppm である、請求項 1 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 3】

前記多価イオンが、アルミニウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの 1 つから選ばれる、請求項 2 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。 10

【請求項 4】

前記多価イオンがカルシウムイオンであり、カルシウムイオンの量が約 10 ~ 約 2,000 ppm である、請求項 3 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 5】

カルシウムイオンの量が約 200 ~ 約 600 ppm である、請求項 4 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 6】

水溶液中の相分離の量が多くて約 10 % である、請求項 1 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。 20

【請求項 7】

水溶液中の相分離の量が多くて約 5 % である、請求項 6 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 8】

水溶液中の相分離の量が多くて約 3 % である、請求項 7 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 9】

約 45 ~ 65 % のエステル化度を有する、請求項 1 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 10】

約 55 ~ 59 % のエステル化度を有する、請求項 9 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。 30

【請求項 11】

約 200 cP よりも大きいカルシウム感度もしくは 20 よりも大きいカルシウム率、および約 5 ~ 25 % のエステル化度を有する、請求項 9 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 12】

約 200 cP よりも大きいカルシウム感度もしくは 20 よりも大きいカルシウム率、および約 8 ~ 15 % のエステル化度を有する、請求項 11 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。 40

【請求項 13】

単離高メトキシルペクチンを酵素で処理することにより調製される、請求項 1 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 14】

前記酵素が、りんご、アブリコット、アボカド、バナナ、ベリー、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パパイア、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも 1 つから選ばれる植物組織から抽出される、請求項 13 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチン。

【請求項 15】

前記酵素がパパインである、請求項 1 3 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 1 6】

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 6 8 ~ 7 2 % であるときに、約 4 5 ~ 6 5 % のエステル化度を有する、請求項 1 3 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 1 7】

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 6 8 ~ 7 2 % であるときに、約 5 5 ~ 5 9 % のエステル化度を有する、請求項 1 6 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 1 8】

前記単離高メトキシルペクチンが約 6 0 % よりも大きいエステル化度を有する、請求項 1 3 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 1 9】

前記単離高メトキシルペクチンが約 6 7 % よりも大きいエステル化度を有する、請求項 1 8 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 2 0】

前記単離高メトキシルペクチンが水性形もしくは粉末形である、請求項 1 3 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 2 1】

前記単離高メトキシルペクチンが、柑橘類の皮、リンゴジュース、りんごサイダー、りんごボマード、さとうだいこん、ひまわりの穂先、野菜、あるいはりんご、さとうだいこん、ひまわりおよび柑橘類の少なくとも 1 つから選ばれる植物からの廃棄物の少なくとも 1 つから得られる、請求項 1 3 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 2 2】

前記単離高メトキシルペクチンが、ライム、レモン、グレープフルーツ、タンジェリンおよびオレンジの少なくとも 1 つから得られる、請求項 2 1 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 2 3】

前記単離高メトキシルペクチンを酵素で処理することにより調製され、前記酵素が、りんご、アプリコット、アボカド、バナナ、ベリー、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パパイア、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも 1 つから選ばれる植物組織から抽出される、請求項 9 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 2 4】

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 6 8 ~ 7 2 % であるときに、約 4 5 ~ 6 5 % のエステル化度を有する、請求項 2 3 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチン。

【請求項 2 5】

少なくとも 1 つの単離高メトキシルペクチンを少なくとも 1 つの脱エステル酵素で処理することを含む酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法であって、前記酵素ブロックト脱エステルペクチンが擬似塑性を示し、かつ少なくとも 1 つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さないことを特徴とする前記方法。

【請求項 2 6】

多価イオンの量が約 1 0 ~ 約 2 , 0 0 0 p p m である、請求項 2 5 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 2 7】

前記多価イオンが、アルミニウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの 1 つから選ばれる、請求項 2 6 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

前記多価イオンがカルシウムイオンであり、カルシウムイオンの量が約 10 ~ 約 2,000 ppm である、請求項 27 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 29】

カルシウムイオンの量が約 200 ~ 約 600 ppm である、請求項 28 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 30】

水溶液中の相分離の量が多くて約 10 % である、請求項 25 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

10

【請求項 31】

水溶液中の相分離の量が多くて約 5 % である、請求項 30 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 32】

水溶液中の相分離の量が多くて約 3 % である、請求項 31 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 33】

前記酵素が、りんご、アプリコット、アボカド、バナナ、ベリー、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パパイア、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも 1 つから選ばれる植物組織から抽出される、請求項 25 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

20

【請求項 34】

前記酵素がパパイアである、請求項 25 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 35】

前記単離高メトキシルペクチンが、柑橘類の皮、リンゴジュース、リンゴサイダー、りんごポマード、さとうだいこん、ひまわりの穂先、野菜、あるいはりんご、さとうだいこん、ひまわりおよび柑橘類の少なくとも 1 つから選ばれる植物からの廃棄物の少なくとも 1 つから得られる、請求項 25 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

30

【請求項 36】

前記単離高メトキシルペクチンが、ライム、レモン、グレープフルーツ、タンジェリンおよびオレンジの少なくとも 1 つから得られる、請求項 35 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 37】

前記単離高メトキシルペクチンが水性形もしくは粉末形である、請求項 25 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 38】

前記単離高メトキシルペクチンが約 60 % よりも大きいエステル化度を有する、請求項 25 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

40

【請求項 39】

前記単離高メトキシルペクチンが約 67 % よりも大きいエステル化度を有する、請求項 38 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 40】

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 68 ~ 72 % であるときに、酵素ブロック脱エステルペクチンのエステル化度が約 45 ~ 65 % である、請求項 25 に記載の酵素ブロック脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 41】

50

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 68 ~ 72 % であるときに、酵素ブロックト脱エステルペクチンのエステル化度が約 55 ~ 59 % である、請求項 40 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 42】

前記単離高メトキシルペクチンが、柑橘類の皮、リンゴジュース、りんごサイダー、りんごポマード、さとうだいこん、ひまわりの穂先、野菜、あるいはりんご、さとうだいこん、ひまわりおよび柑橘類の少なくとも 1 つから選ばれる植物からの廃棄物の少なくとも 1 つから得られる、請求項 25 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 43】

前記単離高メトキシルペクチンが、ライム、レモン、グレープフルーツ、タンジェリンおよびオレンジの少なくとも 1 つから得られる、請求項 42 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 44】

前記単離高メトキシルペクチンが水性形もしくは粉末形である、請求項 43 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 45】

酵素ブロックト脱エステルペクチンが約 200 c P よりも大きい感度もしくは 20 よりも大きいカルシウム率、および約 5 ~ 25 % のエステル化 Δ 度を有する、請求項 44 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 46】

酵素ブロックト脱エステルペクチンが約 200 c P よりも大きいカルシウム感度もしくは 20 よりも大きいカルシウム率、および約 8 ~ 15 % のエステル化 Δ 度を有する、請求項 45 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 47】

酵素ブロックト脱エステルペクチンが約 45 ~ 65 % のエステル化度を有する、請求項 46 に記載の酵素ブロックト脱エステルペクチンを製造する方法。

【請求項 48】

酵素で脱エステルされた酵素ブロックト脱エステルペクチンを酸性液体系に添加することを含み、前記酵素ブロックト脱エステルペクチンが擬似塑性を示し、かつ少なくとも 1 つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さない、不溶性成分を酸性液体系に懸濁する方法。

【請求項 49】

多価イオンの量が約 10 ~ 約 2,000 ppm である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記多価イオンが、アルミニウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの 1 つから選ばれる、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記多価イオンがカルシウムイオンであり、カルシウムイオンの量が約 10 ~ 約 2,000 ppm である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

カルシウムイオンの量が約 200 ~ 約 600 ppm である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

水溶液中の相分離の量が多くて約 10 % である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 54】

水溶液中の相分離の量が多くて約 5 % である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

水溶液中の相分離の量が多くて約 3 % である、請求項 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記酵素ブロックト脱エステルペクチンが約 200 c P よりも大きいカルシウム感度もし

10

20

30

40

50

くは20よりも大きいカルシウム率、および約5～25%のエステル化Δ度を有する、請求項48に記載の方法。

【請求項57】

さらにカルシウムイオンを前記酸性液体系に添加することを含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

カルシウムイオンの量が約10～約2,000ppmである、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

カルシウムイオンの量が、約50～約1,000ppmである、請求項58に記載の方法。

10

【請求項60】

カルシウムイオンの量が約200～約600ppmである、請求項59に記載の方法。

【請求項61】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約0.001～約0.2である、請求項57に記載の方法。

【請求項62】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約0.005～約0.01である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約0.02～約0.06である、請求項62に記載の方法。

20

【請求項64】

前記酸性液体系が蛋白質を含む、請求項56に記載の方法。

【請求項65】

前記蛋白質が、しょう油、ホエーおよびカゼインの少なくとも1つである、請求項60に記載の方法。

【請求項66】

さらに食物、化粧品もしくは医薬製品を前記酸性液体系に添加することを含み、前記食物製品が果物および野菜の少なくとも1つを含む、請求項57に記載の方法。

【請求項67】

前記酸性液体系がカルシウムイオンを含む、請求項48に記載の方法。

30

【請求項68】

カルシウムイオンの量が約10～約2,000ppmである、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

カルシウムイオンの量が約50～約1000ppmである、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

カルシウムイオンの量が約200～約600ppmである、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約0.005～約0.01である、請求項67に記載の方法。

40

【請求項72】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約0.02～約0.06である、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

前記酸性液体系が蛋白質を含む、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

前記酸性液体系が蛋白質を含み、前記蛋白質が、しょう油、ホエーおよびカゼインの少なくとも1つである、請求項67に記載の方法。

【請求項75】

さらに食物、化粧品もしくは医薬製品を前記酸性液体系に添加することを含む、請求項6

50

7 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記食物製品が果物および野菜の少なくとも 1 つを含む、請求項 7 5 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記酵素脱エステルペクチンの量が、前記最終酸性液体系中約 0 . 0 1 ~ 約 3 . 0 乾量 % である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記酵素脱エステルペクチンの量が、前記最終酸性液体系中約 0 . 0 5 ~ 約 0 . 6 乾量 % である、請求項 7 7 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記酵素脱エステルペクチンの量が、前記最終酸性液体系中約 0 . 1 5 ~ 約 0 . 3 5 乾量 % である、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記酸性液体系の p H が約 2 . 0 ~ 約 5 である、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記酸性液体系の p H が約 2 . 5 ~ 約 4 . 5 である、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記酸性液体系の p H が約 3 ~ 約 4 である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記酵素ブロック脱エステルペクチンが約 2 0 0 c P よりも大きいカルシウム感度もしくは 2 0 よりも大きいカルシウム率、および約 5 ~ 2 5 % のエステル化 Δ 度を有する、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記酵素ブロック脱エステルペクチンが単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製され、前記酵素が、りんご、アブリコット、アボカド、バナナ、ベリー、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パイナップル、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも 1 つから選ばれる植物組織から抽出される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記酵素ブロック脱エステルペクチンが単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製され、前記酵素がパパインである、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 6 8 ~ 7 2 % であるときに、前記酵素ブロック脱エステルペクチンが約 4 5 ~ 6 5 % のエステル化度を有する、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 6 8 ~ 7 2 % であるときに、前記酵素ブロック脱エステルペクチンが約 5 5 ~ 5 9 % のエステル化度を有する、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

(a) 擬似塑性を示し、かつ少なくとも 1 つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さない少なくとも 1 つの酵素ブロック脱エステルペクチン；および (b) 少なくとも 1 つの酸性液体溶液を含む安定化酸性液体系。

【請求項 8 9】

多価イオンの量が約 1 0 ~ 約 2 , 0 0 0 p p m である、請求項 8 8 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 9 0】

前記多価イオンが、アルミニウムイオン、鉄イオン、マンガンイオン、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンの 1 つから選ばれる、請求項 8 9 に記載の安定化酸性液体系。

10

20

30

40

50

【請求項 9 1】

前記多価イオンがカルシウムイオンであり、カルシウムイオンの量が約 1 0 ~ 約 2 , 0 0 0 p p m である、請求項 9 0 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 9 2】

カルシウムイオンの量が約 2 0 0 ~ 約 6 0 0 p p m である、請求項 9 1 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 9 3】

水溶液中の相分離の量が多くて約 1 0 % である、請求項 8 8 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 9 4】

水溶液中の相分離の量が多くて約 5 % である、請求項 9 3 に記載の安定化酸性液体系。 10

【請求項 9 5】

水溶液中の相分離の量が多くて約 3 % である、請求項 9 4 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 9 6】

さらにカルシウムイオンを前記酸性液体溶液に添加することを含む、請求項 8 8 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 9 7】

カルシウムイオンの量が約 1 0 ~ 約 2 , 0 0 0 p p m である、請求項 9 6 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 9 8】

カルシウムイオンの量が、約 5 0 ~ 約 6 0 0 p p m である、請求項 9 7 に記載の安定化酸性液体系。 20

【請求項 9 9】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約 0 . 0 0 1 ~ 約 0 . 2 である、請求項 9 6 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 0】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約 0 . 0 0 5 ~ 約 0 . 0 1 である、請求項 9 6 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 1】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約 0 . 0 2 ~ 約 0 . 0 6 である、請求項 1 0 0 に記載の安定化酸性液体系。 30

【請求項 1 0 2】

前記酸性液体溶液が蛋白質を含む、請求項 9 6 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 3】

前記蛋白質が、しょう油、ホエーおよびカゼインの少なくとも 1 つである、請求項 1 0 2 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 4】

さらに食物、化粧品もしくは医薬製品を前記酸性液体溶液に添加することを含む、請求項 9 6 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 5】

前記食物製品が果物および野菜の少なくとも 1 つを含む、請求項 1 0 4 に記載の安定化酸性液体系。 40

【請求項 1 0 6】

前記酸性液体溶液がカルシウムイオンを含む、請求項 8 8 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 7】

カルシウムイオンの量が約 1 0 ~ 約 2 , 0 0 0 p p m である、請求項 1 0 6 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 8】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約 0 . 0 0 1 ~ 約 0 . 2 である、請求項 1 0 7 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 1 0 9】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約 0.005 ~ 約 0.01 である、請求項 106 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 110】

前記酵素脱エステルペクチンと前記カルシウムイオンとの重量比が約 0.02 ~ 約 0.06 である、請求項 109 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 111】

カルシウムイオンの量が約 50 ~ 約 1,000 ppm である、請求項 110 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 112】

前記酸性液体溶液が蛋白質を含み、前記蛋白質が、しょう油、ホエーおよびカゼインの少なくとも 1 つである、請求項 106 に記載の安定化酸性液体系。 10

【請求項 113】

さらに食物、化粧品もしくは医薬製品を前記酸性液体溶液に添加することを含む、請求項 106 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 114】

前記食物製品が果物および野菜の少なくとも 1 つを含む、請求項 113 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 115】

前記酵素脱エステルペクチンの量が、前記最終酸性液体溶液中約 0.01 ~ 約 3.0 乾量 % である、請求項 88 に記載の安定化酸性液体系。 20

【請求項 116】

前記酵素脱エステルペクチンの量が、前記最終酸性液体溶液中約 0.05 ~ 約 0.6 乾量 % である、請求項 115 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 117】

前記酸性液体溶液の pH が約 2.5 ~ 約 5 である、請求項 88 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 118】

約 200 cP よりも大きいカルシウム感度もしくは 20 よりも大きいカルシウム率、および約 5 ~ 25 % のエステル化 Δ 度を有する、請求項 88 に記載の安定化酸性液体系。

【請求項 119】

前記酵素ブロット脱エステルペクチンが単離高メトキシルペクチンを酵素で処理することにより調製され、前記酵素が、りんご、アプリコット、アボカド、バナナ、ベリー、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パパイヤ、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも 1 つから選ばれる植物組織から抽出される、請求項 88 に記載の安定化酸性液体系。 30

【請求項 120】

前記酵素ブロット脱エステルペクチンが単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製され、前記酵素がパパインである、請求項 88 に記載の安定化酸性液体系。 40

【請求項 121】

前記単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約 68 ~ 72 % であるときに、前記酵素ブロット脱エステルペクチンが約 45 ~ 65 % のエステル化度を有する、請求項 88 に記載の安定化酸性液体系。

【発明の詳細な説明】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、本明細書に "Low Methoxyl Pectins, Processes Thereof, and Stabilized Aqueous Systems Comprising the Same" と題する米国出願第 09/569,888 号の内 30

容すべてを取り込み、かつ2000年10月10日に出願された米国出願第09/684,968号にも関連する。

【0002】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、擬似塑性を示し、かつ少なくとも1つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さない酵素ブロック脱エステルペクチン、および同ペクチンを製造する方法に向けられる。特に、本発明は、単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製される酵素ブロック脱エステルペクチンに向けられる。本発明は、また単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製される酵素ブロック脱エステルペクチンを用いる粒子を懸濁する方法にも向けられる。さらに、本発明は、単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製される酵素ブロック脱エステルペクチンを含む安定化水性系に関する。

10

【0003】

2. 発明の背景および関連技術

パルプ、精油などの不溶性成分を含む飲料が直面する問題は、不溶性成分が、例えば、沈降もしくはクリーミングにより、分離する傾向である。

懸濁液に不溶性成分を保持するために、キサンタンを果物飲料に添加して飲料の粘度を上げたり、あるいは飲料のレオロジーを変えたりしてきた。キサンタンは、低濃度でも水溶液に添加されると、チキソトロピーのしるしなしで低濃度で非常に強い擬似塑性および粘塑性を示す。しかし、キサンタンは、飲料にマイナスの官能的知覚（望ましくない口当たり）を付加する。したがって、望ましくない口当たりなしでキサンタンの望ましい特性を有する懸濁助剤を与える必要がある。

20

【0004】

アルギネートおよびペクチンはマイナスの口当たりを付加しないので、飲料に用いられて粘度を上げてきた。しかし、この用途に有用なアルギネートおよびペクチンは、長期貯蔵の間にシネレシスを受ける傾向がある。減少したシネレシス性を有する懸濁助剤としてペクチンを用いる試みがなされてきたが、成功していない。

【0005】

ペクチンは、植物細胞中に普通保護の形で見出される構造多糖である。ペクチンの主鎖は、少数の1,2結合-L-ラムノースユニットで中断される-1-4結合ガラクトン酸残基を含む。ガラクトン酸残基のカルボキシル基のいくつかは、典型的にはメチル基によりエステル化されている。残りの残基は遊離カルボキシル基として存在する。カルボキシル基のエステル化は、ガラクトン酸残基の重合後植物組織中で起こる。しかし、カルボキシル基のすべてがエステル化するのは極めてまれである。通常、エステル化度は、有効カルボキシル基の0~90%に変化する。

30

【0006】

「エステル化度」という語は、ペクチンのポリガラクトン酸鎖に含まれる遊離カルボン酸基がエステル化された（例えば、メチル化により）、あるいは他の方法で非酸性にされた（例えば、アミド化により）程度を意味すると意図される。

40

【0007】

ペクチンは低メトキシルペクチン（LMP）もしくは高メトキシルペクチン（HMP）のいずれかとして入手可能である。本明細書で定義される低メトキシルペクチンは、約45%未満のエステル化度（DE）を有し、かつカルシウムなどの陽イオンに高反応性である。本明細書で定義される高メトキシルペクチンは、約45%よりも大きいDEを有し、かつ典型的にカルシウムなどの多価陽イオンに低反応性である。

【0008】

ペクチンの構造、特にエステル化度は、その物理的および/または化学的性質の多くを指令する。例えば、カルシウム陽イオンの存在により起こるゲル化は、特にエステル化度に依存する。ゲル化は、連続三次元ゲル化マトリックスを生成させる多くのペクチン鎖の遊

50

離カルボキシル基との架橋結合錯化合物を生成するカルシウムイオンから生じると信じられている。

【0009】

ペクチンは、初めに抽出されたときに、約70～75%の比較的高いエステル化度を有する。そのようなペクチンは、ジャムおよびゼリーでの使用に理想的である。しかし、他の用途は異なるゲル化特性を有するペクチンの調製を必要とする。これは、ペクチンを改変してエステル化度を減少させることにより達成できる。これを達成するための1つの一般的な方法は、酸水解である。代替的方法是、低温でのアルカリ、アンモニア、もしくはペクチンメチルエステラーゼの使用に向けられる。

【0010】

脱エステルの間、ペクチン上のエステル基を無作為もしくはブロック様に除去できる。エステル基をペクチン鎖の2つ以上の上にあるガラクトuron酸残基から非逐次的に除去したときに、それらは「無作為」に脱エステルされたと称される。エステル基を非還元末端で、もしくは遊離カルボキシル基の隣で単鎖メカニズムにより逐次的に除去したとき、未エステル化ガラクトuron酸ユニットのブロックが創造されるので、それらは「ブロック様」に脱エステルされたと称される。逐次的もしくはブロック様除去エステルは、典型的にペクチンメチルエステラーゼにより達成される。ブロック様脱エステルにより生成する未エステル化ガラクトuron酸ユニットは、カルシウムなどの多価陽イオンに高反応性である。そのような未エステル化ガラクトuron酸のブロックを有するペクチンは、「カルシウム感受性」と言われる。

10

20

【0011】

ペクチンのメチル分を植物組織に存在する植物ペクチンエステラーゼにより性質を改変することは周知である。普通ペクチンメチルエステラーゼ(PMEs)と呼ばれるこれらの植物エステラーゼの多くは、少なくとも2つの隣接する遊離カルボン酸基の隣にあるエステル化カルボキシル基を脱メチル化する。脱メチル化は、この方法でブロック生成を進める。例えば、植物組織からの未精製プロテアーゼパパインおよびブロメラインも、ブロック様にペクチンを脱メチル化する汚染物としてペクチンメチルエステラーゼを含むことも既知である。

【0012】

小程度で、未エステル化ガラクトuron酸ユニットのこれらのブロックが、初めに単離されたときに市販の高DEペクチンに自然に生じる。市販の、およそ68～74%の典型的なエステル化度を有するペクチンでは、遊離カルボキシルブロックの長さは分子ごとに変化し得、それぞれのペクチン分子は典型的に異なる長さのいくつかのブロックを含む。例えば、ポリマー鎖に沿った遊離カルボキシル基の分布が、ペクチンが酸化乳飲料の安定剤としての使用に適するかどうか決定するために重要であることは既知である。ペクチンが、ブロック脱エステル領域が生じるペクチン分子の特定の箇所でカゼイン粒子の表面に吸着することによりカゼイン粒子の懸濁液を安定化できる、と提唱されてきた。カゼイン粒子表面の有意な比率の完全な安定化を得ることは、ペクチンが受け持つべきである。にもかかわらず、カゼイン安定化は別として、これらのペクチンは、典型的な飲料用途でパルプもしくは他の材料の安定化に限られた実用性を見出している。

30

40

【0013】

無作為に脱エステルされたペクチンも、液体食物および飲料中の粒子安定化での使用についてテストされてきた。低メトキシルペクチンに無作為に還元された市販のペクチンも、カルシウムなどの多価陽イオンと反応性となり得る。カルシウムは、これらの型のペクチンを包含する食物ゲル用途の多価陽イオンのもっとも一般的な源である。ゲル化は、ホモガラクトuron酸ユニット間の分子間接続区画の形成による。結合の静電性質のために、ペクチンゲルは、カルシウムイオンを隣接するペクチン分子に結合するカルボキシル基の環境を変性できる状態に非常に感受性である。ペクチンのゲル生成能力はDEを低下すると増大し、多くの遊離カルボキシル基を有する低メトキシルペクチンは、低カルシウムレベルに非常に感受性である。ペクチン主鎖に沿った遊離カルボキシル基の数が増大すると、

50

カルシウムに対する感度が増大する。しかし、低 D E ペクチンのカルシウムに対する増大する感度に関連する典型的な問題は、ペクチンがゲル化してシネレシスを示す増大した傾向である。これらの型の無作為に脱エステルされたペクチンにおけるゲル収縮およびシネレシスの性質は、液体食物および飲料中の粒子の安定化に適さない。

【0014】

ペクチンを懸濁助剤として用いる他の試みが、当業界でなされてきた。例えば、B a r e y による米国特許第 5, 8 6 6, 1 9 0 号は、ペクチンおよびアルギネートを含む不溶性成分を含む非乳飲料を安定化するための組成物を開示している。B a r e y のペクチンは、アミド化もしくは非アミド化 H M P s および L M P s であり得る。しかし、これらの組成物は、この用途に望ましくないシネレシスを示す。また、ペクチン / アルギネート混合物が遊離カルシウムイオンの不在下で水性媒体に溶解すること、もしくはカルシウム錯生成剤を用いることは、必須である。錯生成剤をペクチン / アルギネート溶液もしくは果汁に添加する。

10

【0015】

C h r i s t e n s e n からの W O 9 7 / 0 3 5 7 4 は、酸性環境で組換え体 D N A 技術により調製された高エステルペクチンで蛋白質を安定化する方法に関する。C h r i s t e n s e n の高エステルペクチンは、約 7 0 ~ 8 0 % のエステル化度を有する。しかし、C h r i s t e n s e n の高エステルペクチンは、低濃度で水溶液に擬似塑性ではなく、懸濁助剤としては限られた価値を有する。

【0016】

上記のことをかんがみて、水性食物、化粧品および医薬製品における使用で剪断減粘挙動を有するペクチン懸濁助剤に対する既存の要求がある。

20

【0017】

また、ペクチンが粒子懸濁助剤としての使用で剪断減粘挙動（擬似塑性）および許容できる口当たりを有する安定した水性系を生ずるための既存要求がある。擬似塑性は、水溶液中の粒子の安定化にもっとも望ましいレオロジー挙動である。水溶液は、それが剪断速度増加で低下する粘度を示すなら、擬似塑性であると特徴づけられる。「安定した水性系」とは、ゲル生成なしで、もしくは相分離およびシネレシスなしで安定した粘度を維持できる水性系をいう。「安定した粘度」もしくは「安定度」とは、懸濁液中の不溶性成分の維持および初めに生成した懸濁液の均質性をいう。レオロジー的には、水性系の擬似塑性は、少なくとも 1 ~ 1 2 ヶ月以上の期間安定している。

30

【0018】

さらに、5 0 0 m M など、比較的高レベルのカルシウムの存在下ですら貯蔵でシネレシスを受けたり、分離ゲル相を生成したりしないペクチンに対する既存の要求がある。

発明の要旨

上記のことをかんがみて、本発明の 1 つの側面は、擬似塑性を示し、かつ少なくとも 1 つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的にゲル収縮を示さない酵素ブロック脱エステルペクチン、および同ペクチンを製造する方法に向けられる。特に、本発明は、単離高メトキシルペクチンを酵素で脱エステルすることにより調製される酵素ブロック脱エステルペクチンに向けられる。

40

【0019】

本発明の酵素ブロック脱エステルペクチンは、好ましくは約 4 5 ~ 6 5 %、より好ましくは約 5 5 ~ 5 9 % のエステル化度を有する。

【0020】

本発明の酵素ブロック脱エステルペクチンは、好ましくは約 2 0 0 c P よりも大きいカルシウム感度もしくは 2 0 よりも大きいカルシウム率、および約 5 ~ 2 5 %、より好ましくは約 8 ~ 1 5 % のエステル化 Δ 度を有する。

【0021】

本発明の酵素ブロック脱エステルペクチンは、好ましくは単離高メトキシルペクチンを酵素で処理することにより調製される。酵素は、りんご、アブリコット、アボカド、バナ

50

ナ、ベリー、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パパイア、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも1つから選ばれる植物組織から抽出され、好ましくはパパインである。

【0022】

酵素ブロック脱エステルペクチンは、好ましくは単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約68~72%であるときに、約45~65%のエステル化度を有し、より好ましくは単離高メトキシルペクチンのエステル化度が約68~72%であるときに、約55~59%のエステル化度を有する。単離高メトキシルペクチンは、好ましくは約60%よりも大きい、より好ましくは約67%よりも大きいエステル化度を有する。単離高メトキシルペクチンは、好ましくは水性形もしくは粉末形である。

10

【0023】

単離高メトキシルペクチンは、好ましくは、柑橘類の皮、リンゴジュース、リンゴサイダー、りんごボマード、さとうだいこん、ひまわりの穂先、野菜、あるいはりんご、さとうだいこん、ひまわりおよび柑橘類の少なくとも1つから、より好ましくはライム、レモン、グレープフルーツ、タンジェリンおよびオレンジの少なくとも1つから選ばれる植物からの廃棄物の少なくとも1つから得られる。

【0024】

本発明の酵素ブロック脱エステルペクチンは、好ましくは単離高メトキシルペクチンを酵素で処理することにより調製され、酵素は、りんご、アプリコット、アボカド、バナナ、ベリー、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パパイア、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも1つから選ばれる植物組織から抽出される。

20

【0025】

さらに、本発明は、また酵素ブロック脱エステルペクチンを酸性液体系に添加することを含む不溶性粒子を懸濁する方法にも向けられる。酵素ブロック脱エステルペクチンは、好ましくは約200cPよりも大きいカルシウム感度もしくは20よりも大きいカルシウム率、および約5~25%のエステル化Δ度を有する。

【0026】

本発明の粒子を懸濁する方法は、カルシウムイオンを酸性液体系に添加することを含む。カルシウムイオンの量は、好ましくは約10~約2000ppm、より好ましくは約50~約1000ppm、もっとも好ましくは約200ppm~約600ppmである。

30

【0027】

酸性液体系は、しょう油、ホエーおよびカゼインの少なくとも1つから選ばれる蛋白質を含み得る。

【0028】

本発明の不溶性成分を懸濁する方法は、さらに食物、化粧品もしくは医薬製品を酸性液体系に添加することも含み得る。

【0029】

さらに、本発明は、(a)擬似塑性を示し、かつ少なくとも1つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さない少なくとも1つの酵素ブロック脱エステルペクチン；および(b)少なくとも1つの酸性液体溶液を含む安定化水性系に関する。安定化系は、さらにカルシウムイオンを酸性液体溶液に添加することも含み得る。カルシウムイオンの量は、好ましくは約10~約2000ppm、より好ましくは約50~約600ppmである。

40

【0030】

安定化系の酸性液体溶液は、しょう油、ホエーおよびカゼインの少なくとも1つから選ばれる蛋白質を含む。酸性液体溶液は、さらに食物、化粧品もしくは医薬製品を含み得る。食物製品は、果物および野菜のすくなくとも1つを含む。酸性液体溶液は、カルシウムイ

50

オンも含み得る。

【0031】

したがって、(1) 剪断減粘性を有し；(2) 許容できる口当たりを有する剪断減粘性を有し；(3) 比較的高レベルのカルシウムの存在下で貯蔵でシネレシスを受けたり、分離ゲル相を生成したりしない；そして(4) 長期貯蔵の間にレオロジーにおける最小限の変化；(5) 低使用レベルで有効である酸性液体系で不溶性成分懸濁に使用するペクチンを提供できることが望ましい。

発明の詳細な説明

本発明は、低使用レベルで擬似塑性を示し、かつ少なくとも1つの多価陽イオンを含む水溶液に実質的に相分離を示さない酵素ブロックト脱エステルペクチンに向けられる。

10

【0032】

擬似可塑性は、水溶液中の粒子の安定化にもっとも望ましいレオロジー挙動である。水溶液は、それが剪断速度増加で低下する粘度を示すなら、擬似塑性であると特徴づけられる。これはまた「剪断減粘」とも称される。この挙動は、溶液中の長鎖分子のからみ合いにより生じる網状構造の形成によると思われる。ペクチンの擬似塑性挙動は、溶液中のペクチン分子の相対的サイズに密に関連する。高分子量ペクチンは、低ペクチン濃度でこの挙動を示す。増大する見掛分子サイズへの1つのアプローチは、酸脱エステルによりカルシウム反応性部位を高メトキシルペクチン分子に導入すること、およびカルシウムをペクチン分子間で架橋結合を形成する溶液に添加することである。しかし、これはゲル粒子形成およびシネレシスに至り、かつこれらのペクチンは、カルシウムが存在するとき溶液中に典型的にチキソトロピー挙動を示す。

20

【0033】

本発明のカルシウム反応性ペクチンは、ゲル収縮もしくはシネレシスなしで非常に低いペクチン濃度で擬似塑性挙動という特異な性質を有し、かつ非チキソトロピーである。さらに、これらの特性は、酸性条件下室温での貯蔵で維持される。

【0034】

「相分離」とは、しばしば透明な境界線を有する、粒子の懸濁床の透明な液体の生成をいう。相分離は、本発明のペクチンを含む水性系に関する粒子沈降をもいう。激しい相分離は、両側および底で粒子床を囲む透明な液体により特徴づけられる。相分離には、それらに限定はされないが、粒子沈降および/またはゲル収縮が含まれ得る。「シネレシス」は、しばしば流体ゲルではなく固定ゲルに関して用いられるが、基本的にはゲル収縮と同じ別の語であり、相分離の別の表示である。相分離を決定するテストは、「粒子沈降の決定」と題する下記実施例の項で記載されるが、それは粒子沈降の相分離を決定するために用いられる。

30

【0035】

「実質的に相分離がない」とは、本発明の酵素ブロックト脱エステルペクチンを含む陽イオン水溶液中10%未満の相分離をいう。本発明の酵素ブロックト脱エステルペクチンの相分離は、好ましくは多くて約10%、より好ましくは多くて約7%、さらに好ましくは約5%、もっとも好ましくは約3%である。

【0036】

本発明の酵素ブロックト脱エステルペクチンは、またカルシウムイオンもしくは他の多価陽イオンと反応したときに水溶液中に非チキソトロピーである。すなわち、本発明の酵素ブロックト脱エステルペクチンは、剪断応力が除去されたときに水溶液が粘度を再建もしくは非常に速やかに回復するのを助ける。剪断応力が加えられた後の粘度再建は、剪断応力が導入される前の粘度の値と基本的に同一である。

40

【0037】

さらに、本発明の酵素ブロックト脱エステルペクチンは少なくとも1つの多価陽イオンを含む水溶液中に実質的に相分離を示さないが、多価陽イオンと反応して、低ペクチン濃度で擬似塑性のためのからみ合いを助ける大きい見掛分子サイズの分子を形成する。多価陽イオンの例には、好ましくは、それらに限定はされないが、アルミニウムイオン、鉄イオ

50

ン、マンガンイオン、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンが含まれ、より好ましくはカルシウムイオンおよびマグネシウムイオンであり、もっとも好ましくはカルシウムイオンである。

【0038】

水溶液に存在する多価陽イオンの量は、好ましくは約10～約2,000ppm、より好ましくは約50～約1,000ppmである。

【0039】

水溶液に存在するカルシウムイオンの量は、好ましくは約10～約2,000ppm、より好ましくは約50～約1,000ppm、もっとも好ましくは約200～約600ppmである。

10

【0040】

本発明の酵素ブロック脱エステルペクチンは、約200センチポアズ(cP)よりも大きいカルシウム感度(CS)もしくは20よりも大きいカルシウム率(CF)、および約5～25%のエステル化Δ度(ΔDE)を有する。より好ましくは、酵素ブロック脱エステルペクチンは、約200cPよりも大きいカルシウム感度もしくは20よりも大きいカルシウム感受ペクチン率、および約7～25%のエステル化Δ度を有する。もっとも好ましくは、酵素ブロック脱エステルペクチンは、約200cPよりも大きいカルシウム感度もしくは20よりも大きいカルシウム感受ペクチン率、および約8～15%のエステル化Δ度を有する。

【0041】

「カルシウム感度(CS)」とは、適切な条件下ペクチン製品の溶液の粘度増大に関連するペクチン製品の性質をいう。「カルシウム率(CF)」とは、カルシウム感度比をいう。CSおよびCFの決定方法は、下記実施例の項で分析手順に記載される。

20

【0042】

前述のように、「エステル化度」という語は、ペクチンのポリガラクトuron酸鎖に含まれる遊離カルボン酸基がエステル化された(例えば、メチル化により)、あるいは他の方法で非酸性にされた(例えば、アミド化により)程度を意味すると意図される。「エステル化Δ度(ΔDE)」とは、酵素脱エステル後のペクチンと比較して酵素脱エステル前のペクチン間のDEにおける相違をいう。DEおよびΔDEの決定方法を参照されたい。

【0043】

本発明の1つの実施態様において、本発明の酵素ブロック脱エステルペクチンは、少なくとも1つの酵素で高メトキシルペクチン出発材料から調製される。酵素は、ペクチンの精製の際存在してもよいが、他の実施態様には、固定化酵素の除去、不活性化もしくは使用が含まれる。もっとも好ましい実施態様は、アルコール中への沈殿前の酵素不活性化が含まれる。

30

【0044】

「ペクチン出発材料」とは、植物材料からのペクチン分離により得られるペクチン製品を意味すると意図される。ペクチン出発材料は、好ましくは柑橘類の皮、リンゴジュース、りんごサイダー、りんごポマード、さとうだいこん、ひまわりの穂先、野菜、あるいはりんご、さとうだいこん、ひまわりおよび柑橘類などなどの植物、より好ましくはりんご、さとうだいこんおよび柑橘類植物、もっとも好ましくはライム、レモン、グレープフルーツおよびオレンジなどの柑橘類植物からの廃棄物から得られる。

40

【0045】

ペクチン出発材料は、例えば、精製前は酸性ペクチンであり得、あるいは酸性ペクチン溶液をアルコールで処理した後に得られる湿潤ペクチンケーキであり得る。さらに、ペクチン出発材料は、例えば、沈殿からのペクチンケーキ中の乾燥もしくは部分乾燥ペクチンであり得、あるいは通常ペクチンメーカー製造の乾燥微粉碎ペクチン粉末でもあり得る。

【0046】

前述のように、本発明による方法は、ペクチン出発材料を少なくとも1つの酵素で脱エステルして酵素ブロック脱エステルペクチンを製造することを含む。本発明のペクチン出

50

発材料は、好ましくは約 60 % よりも大きい、より好ましくは約 65 % よりも大きい、もっとも好ましくは約 67 % よりも大きいエステル化度を有する。

【0047】

本発明の 1 つの実施態様において、単離高メトキシルペクチンのエステル化度が好ましくは約 68 ~ 72 % であるなら、酵素ブロック脱エステルペクチンのエステル化度は、好ましくは約 45 ~ 65 %、より好ましくは約 50 ~ 62 %、もっとも好ましくは約 55 ~ 59 % である。

【0048】

本発明の別の実施態様において、高 DE ペクチン出発材料のエステル化度は、好ましくは酵素ブロック脱エステルペクチンよりも約 5 ~ 25 % 高く、より好ましくは酵素ブロック脱エステルペクチンよりも約 5 ~ 15 % 高く、もっとも好ましくは酵素ブロック脱エステルペクチンよりも約 8 ~ 15 % 高い。

10

【0049】

ついで、前述のように調製された単離高メトキシルペクチンを、酵素を生じることができる植物材料もしくは有機体から単離されたペクチンメチルエステラーゼなどのペクチン脱エステル酵素を用いてほどよく制御される脱エステル処理に供する。例には、それらに限定はされないが、パパイン、フィシンもしくはブロメラインなどのペクチンメチルエステラーゼを含む粗酵素が含まれる。これらのペクチンメチルエステラーゼ酵素はペクチンを脱エステルして、遊離カルボキシル基のブロックを生成する。

【0050】

1 つの実施態様において、単離高メトキシルペクチンの 1 ~ 2 % 水溶液を、ペクチンの完全な溶解を保証するために適切な熱および攪拌を用いて乾燥高 DE ペクチンから調製する。ついで、十分な塩化ナトリウムを沈殿物に添加して、ペクチン溶液調製に用いられる水の原容量に基づいて 1 % w / v 濃度の塩化ナトリウムを得る。塩化ナトリウムは、ペクチン脱エステル酵素の活性を高めることが既知である。ついで、この溶液の温度を、用いられる脱エステル酵素の最適温度に応じて 20 ~ 50 に調整する。ついで、溶液の pH を、0.5 M 水酸化ナトリウム (NaOH) を用いて約 5 ~ 8 に調整する。最後に、ペクチン脱エステル酵素の適量を、制御された脱エステルを成就するために前述の方法により製造されたこれらのいずれかなど、ペクチン溶液に添加する。

20

【0051】

本発明において、ペクチン上のエステル基は、好ましくは脱エステル酵素により、逐次的に除去される。脱エステル酵素もしくはペクチンメチルエステラーゼは、遊離カルボキシル基および遊離メタノールを生むためにペクチンを脱エステルするペクチン酵素である。好ましい実施態様における脱エステル酵素は、ブロック様に (逐次的に) ペクチンを脱エステルする。「ブロック様」もしくは「逐次的」脱エステルは、脱エステル酵素が非還元末端で、もしくは遊離カルボキシル基の隣でペクチンを攻撃し、ついで単鎖メカニズムによりペクチン分子に沿って進むときに起こり、それにより未エステル化ガラクトロン酸ユニットのブロックを創造する。

30

【0052】

ペクチンメチルエステラーゼは、それらに限定はされないが、りんご、アプリコット、アボカド、バナナ、ベリー、いちじく、ライム、グレープフルーツ、マンダリン、チェリー、赤すぐり、ぶどう、マンゴー、パパイヤ、とけいそうの実、桃、西洋なし、プラム、そら豆、にんじん、カリフラワー、きゅうり、リーキ、たまねぎ、えんどう、じゃがいも、はつかだいこんおよびトマトの少なくとも 1 つから選ばれる植物組織から抽出される。酵素は、また異なる源からの 2 つ以上のペクチンメチルエステラーゼの混合物でもよいし、あるいはペクチンに作用する他の酵素を含んでもよい。

40

【0053】

1 つの好ましい実施態様において、酵素はパパイヤから抽出される。より好ましくは、酵素はパパインである。もっとも好ましくは、酵素は、ノースカロライナ州 28224、シャーロット、Gist-Brocades International B.V. 製造の

50

C o l l i p u l i n (登 録 商 標) L i q u i d 製 品 コード 5 0 4 5 である。

【 0 0 5 4 】

反応溶液のpHは、0.5MのNaOHの連続添加により約7に維持される。溶液によるNaOHの捕捉は、脱エステル反応の進行を監視するために用いられる。いったん脱エステルが本発明によるペクチンを製造するために必要な程度まで進むと、反応を、溶液のpHを4以下に低下するための酸添加により停止させる。ついで、反応混合物をおよそ75で15分間加熱して、混合物の冷却により酵素を脱活性化する。ついで、酵素処理ペクチンを、等容量の60~80%IPAを添加することにより溶液から回収できる。不溶性ペクチンを集め、加圧し、追加量のIPAで洗浄し、最後に30~50重量%の乾燥物質に加圧する。

10

【 0 0 5 5 】

酵素ブロック脱エステルペクチンを、さらに乾燥させ、小粒子に微粉碎できる。ペクチンの乾燥は、当業界の技術により(例えば、大気もしくは減圧炉)、約50%未満、好ましくは約25%未満の湿分に達成できる。乾燥温度は、ペクチンが、例えば、色、分子量などの特性を失い始める温度よりも低く維持すべきである。当業界のいずれかの微粉碎技術を用いてペクチン製品を所望の粒度に微粉碎できる。最終製品が、約12重量%以下の湿分を有する乾燥粉末形であることが、もっとも好ましい。「乾燥粉末形」とは、製品が実質的なケーキングなしで注入できることを意味すると意図される。好ましい最終製品は、使用容易性のために粉末形である。

20

【 0 0 5 6 】

本発明の脱エステルペクチンを製造する方法は、連続プロセスもしくは単一バッチ、好ましくは連続プロセスによりなされる。本発明によれば、酵素ブロック脱エステルペクチンを、不溶性成分を酸性液体系に懸濁するプロセスに用いることができる。プロセスには、逐次的パターンで酸性液体系に脱エステルされた脱エステルペクチンを添加することが含まれる。

【 0 0 5 7 】

「不溶性成分」とは、沈降、クリーミングもしくは脱安定化メカニズムなど他のことにより溶液中1つ以上の箇所で相分離する傾向を有するパルプ、精油、天然もしくは他の着色剤、ミネラル、植物性薬品、および医薬品などの不溶性粒子をいう。本発明に関連する相分離のテストを、粒子沈降の相分離のテストである「粒子沈降の決定」と題する下記実施例の項で記載される。

30

【 0 0 5 8 】

本明細書における「酸性液体系もしくは酸性水性系」とは、適切な濃度の多価陽イオンを含むか、もしくは多価陽イオンを添加できる液体形の酸性食物、化粧品および医薬製品をいう。液体食物の例には、それらに限定はされないが、好ましくは果物、野菜もしくはこれらの混合物を含む飲料、スープ、サラダドレッシングおよびソースが含まれる。酸性飲料は、無炭酸もしくは炭酸、未希釈もしくは希釈、甘味料添加もしくは無添加、塩分添加もしくは未添加、アルコール含有もしくは非含有、あるいはこれらの組合せであり得る。

【 0 0 5 9 】

液体酸性化粧品の例には、これらに限定はされないが、香水、日焼ローション、日除けローション、ボディローション、消臭剤、発汗抑制剤、コンディショナーおよびシャンプーが含まれる。液体酸性医薬品の例には、これらに限定はされないが、せき止めシロップ、液体形の頭痛薬、液体形の充血緩和剤および液体形の炎症抑制薬が含まれる。

40

【 0 0 6 0 】

本発明の方法における酸性液体形のpHは、約2.0~約5、好ましくは約2.5~約4.5、より好ましくは約3~約4である。

【 0 0 6 1 】

酸性液体形は、約0.1~約50重量%、好ましくは約1~約30重量%、より好ましくは約5~約20重量%の固形分を有する。

【 0 0 6 2 】

50

本発明の１つの実施態様において、酸性液体系は、約 0.1 ~ 約 50 重量%の固形分、約 0 ~ 約 5 容量%のアルコール分、約 0 ~ 3 %の塩 (NaCl) 分および約 0.1 ~ 約 15 %の砂糖分を有しうる飲料である。

【0063】

本発明の方法における酵素ブロック脱エステルペクチン対酸性液体系の重量比は、約 0.0001 ~ 約 0.03、好ましくは約 0.0005 ~ 約 0.006、より好ましくは約 0.0015 ~ 約 0.035 であり得る。

【0064】

酸性液体系中の酵素ブロック脱エステルペクチンの全量は、約 0.15 ~ 約 0.35 乾量%、好ましくは約 0.05 ~ 約 0.6 乾量%、より好ましくは約 0.1 ~ 約 0.3 乾量% 10

【0065】

水性系は、カルシウムイオンもしくは他の多価陽イオンも含まなければならず、かくてカルシウムイオンの添加は、カルシウムがカルシウム強化剤などの他の成分からすでに存在しているものでなければ、任意ではない。

【0066】

カルシウムイオンは、本発明に記載のペクチンと反応して、低濃度で擬似塑性であって、非チキソトロピーであって、かつ安定性である非常に低い安定した粘度の弱ゲル網状構造を生成する。さらに、このカルシウム - ペクチン溶液は、シネレシスの徴候を示さない。これらの特性は、栄養の目的でカルシウム含有の飲料および医薬製品を強化しようとして 20

これらの特性は、栄養の目的でカルシウム含有の飲料および医薬製品を強化しようとしているメーカーにとって特別な価値がある。約 1000 ppm のカルシウムレベル（すなわち、酸性液体食物 1 グラムにつきミクログラムのカルシウムイオン）は、粒子を安定化する能力に逆効果を与えることなく達成できる。12 流体オンス飲料へのこのレベルのカルシウム添加は、FDA（食物医薬品庁）の推奨する成人のカルシウムとして有意な量の RDA（推奨一日割当量）を示す。

【0067】

カルシウムイオンが酸性液体系に与える「安定した粘度」もしくは「安定度」とは、懸濁液中の不溶性成分の維持および初めに生成した懸濁液の均質性をいう。安定度は、また酸性液体系のレオロジーが少なくとも 1 ~ 12 ヶ月以上の期間安定していることも意味する。 30

【0068】

本発明の方法に用いられるカルシウムイオンは、固体塩の形もしくは溶液であり得る。カルシウム塩の例には、それらに限定はされないが、塩化カルシウム、酢酸カルシウム、プロピオン酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マロン酸カルシウム、グルコン酸カルシウムが含まれ、好ましくは塩酸カルシウム、酢酸カルシウム、プロピオン酸カルシウム、酸化カルシウム、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マロン酸カルシウムおよびグルコン酸カルシウムであり、より好ましくはクエン酸カルシウム、乳酸カルシウム、マロン酸カルシウムおよびグルコン酸カルシウムである。

【0069】

系におけるカルシウムイオンの量は、約 0.001 ~ 約 0.2 % (10 ~ 2000 ppm)、好ましくは約 0.005 ~ 約 0.1 % (50 ~ 1000 ppm)、より好ましくは約 0.02 ~ 約 0.06 % (200 ~ 600 ppm) であり得る。

【0070】

本発明のカルシウムイオン対酵素ブロック脱エステルペクチンの重量比は、約 0.001 ~ 約 10、好ましくは約 0.01 ~ 約 1.0、より好ましくは約 0.03 ~ 約 0.30 であり得る。

【0071】

本発明の方法における酵素ブロック脱エステルペクチン酸性液体系対食物、化粧品もしくは医薬製品の重量比は、約 0.0001 ~ 約 0.03、好ましくは約 0.0005 ~ 約 50

0.006、より好ましくは約0.0015～約0.035であり得る。

【0072】

本発明の酵素ブロック脱エステルペクチンが酸性液体に添加されると、それは長期貯蔵の間レオロジーにおいて最小限の変化を与える。さらに、本発明のペクチンは、許容できる口当たりを有する剪断減粘性を有する。本発明の脱エステルペクチンは、比較的高レベルのカルシウムの存在下貯蔵でシネシス（ゲル収縮形成）を受けたり、分離ゲル相を生成したりしない。

【0073】

本発明の系における酵素ブロック脱エステルペクチンの量は、約0.01～約3乾量%、好ましくは約0.05～約0.6乾量%、より好ましくは約0.1～約0.4乾量%である。 10

【0074】

本発明の酸性液体の例には、それらに限定はされないが、エタノールと水、グリセロールと水、およびプロピレングリコールと水が含まれる。また本発明によれば、酵素ブロック脱エステルペクチンを安定化酸性液体系に用いることができる。本発明の安定化酸性液体系は、酵素ブロック脱エステルペクチンおよび酸性水溶液を含む。

【0075】

本明細書における「酸性液体」とは、水性形である酸性食物、化粧品および医薬製品をいう。液体食物の例には、それらに限定はされないが、好ましくは果物、野菜もしくはこれらの混合物を含む飲料、スープ、サラダドレッシングおよびソースが含まれる。酸性飲料は、無炭酸もしくは炭酸、未希釈もしくは希釈、甘味料添加もしくは無添加、塩分添加もしくは未添加、アルコール含有もしくは非含有、あるいはこれらの組合せであり得る。 20

【0076】

液体酸性化粧品の例には、これらに限定はされないが、香水、日焼ローション、日除けローション、ボディローション、消臭剤、発汗抑制剤、コンディショナーおよびシャンプーが含まれる。液体酸性医薬品の例には、これらに限定はされないが、せき止めシロップ、液体形の頭痛薬、液体形の充血緩和剤および液体形の炎症抑制薬が含まれる。

【0077】

本発明の酸性水溶液のpHは、約2.0～約5、好ましくは約2.5～約4.5、より好ましくは約3～約4である。 30

【0078】

酸性水溶液は、約0.1～約50容量%、好ましくは約1～約30容量%、より好ましくは約4～約18容量%の含有率を有する。

【0079】

安定化酸性液体系における酸性水溶液は、約2.5～約5、好ましくは約2.8～約4.5、より好ましくは約3～約5である。

【0080】

さらに、系は、食物、化粧品もしくは医薬製品を含み得る。代替的に、系は、さらに(1)カルシウムイオンおよび(2)食物、化粧品もしくは医薬製品を含み得る。

【0081】

安定化酸性液体系中の酵素ブロック脱エステルペクチンとカルシウムイオンとの重量比は、約0.001～約0.2、好ましくは約0.005～約0.01、より好ましくは約0.02～約0.06である。 40

【0082】

さらなる詳細な説明なしで、当業者は、前記記載を用いて、本発明を最大限に利用できると信じられる。

【0083】

したがって、下記好ましい実施態様は、単なる説明であり、開示の残りをいかなる方法によっても限定しないと解釈すべきである。

実施例

下に与えられる実施例 1 ~ 6 は、当業界で既知の脱エステルペクチンと本発明の脱エステルペクチンとの異なる物理的性質、および同ペクチンの調製および使用方法を説明する。また下で説明されているのは、脱エステルペクチンの物理的性質を決定する分析手順である。

分析手順

カルシウム感度測定法

カルシウム感度は、好ましくはガムを有する溶液中でペクチンのカルシウム感度 (CS) を測定することにより計算できる。特に、カルシウム塩およびペクチンを、カルシウムイオンとペクチンの強いゲル化がない低 pH で混合する。ついで、ペクチンとカルシウムイオン間の反応を、酢酸ナトリウム / 酢酸緩衝液の添加により開始する。この計算に用いられる装置は、以下のとおりである：(1) プレート電磁攪拌機 (IKA MAG EOA 9)；(2) 電磁攪拌機 (JK IKA - Combimag REO)；(3) 50 x 110 mm 粘度グラス (Holm & Halby)；(4) 25 ml ディスペンサー；(5) 5 ml 自動ピペット；(6) ブルックフィールド粘度計 LVT；(7) pH メーター；(8) 工業天秤；(9) 分析天秤；(10) 42 mm TRIKA マグネット；および (11) 冷却浴 (25 でサーモスタット制御)。

【0084】

この計算に用いられる試薬は、(1) 1.000 M HCl；(2) pH 4.75 で 1 M アセテート緩衝液 (68.04 g / l の 500 mM CH₃COONa および 3 H₂O、ならびに 28.6 ml / l の 500 mM CH₃COOH (100%))；および (3) 250 mM 塩化カルシウム (36.7550 g / l の CaCl₂ および 2 H₂O)。1.0 uS / cm 以下の導電率を有するイオン交換水を、全溶液に用いなければならない。ペクチン溶液は、2.4 g の純ガム (0.6 % ゴル) を有する 400 g ペクチン溶液を含む。テスト試料が 100 % ガム (純ガム) でないときは、試料を下記公式を用いて修正する (A = 試料のガム %)：

$(0.6 \times 400) / A = 400 \text{ g 溶液用 } A \% \text{ ガムを有する g 試料。}$

【0085】

カルシウム感度を計算する手順は、下記のとおりである：(1) 調整した砂糖パーセンテージを有するペクチンを小数第 3 位まで量り分ける；(2) ペクチンを高剪断ミキサー中の 240 ml 沸騰イオン交換水に分散させる；(3) 溶液をマグネット付き風袋を計ったビーカーに注入する；(4) 追加の 400 ml イオン交換水をミキサーに注入し、溶液に添加する；(5) ペクチン溶液を約 25 まで冷却する；(6) ペクチン溶液を 1 M HCl で 1.5 の pH に調整する；(7) 溶液を 400 g に量る；(8) 粘度グラス中で 145 g ± 1 g ペクチン溶液を量り分ける；(9) TRIKA マグネットをグラスに入れる；(10) 工程 (1) でプレート電磁攪拌機で攪拌しながら、5 ml の 250 mM Ca⁺⁺ 溶液をペクチン溶液に添加する、2 分間攪拌；(11) 電磁攪拌機 (JK IKA - Combimag REO) で攪拌しながら、25 ml の 1 M アセテート緩衝液をディスペンサーでグラスに添加する (pH は約 4.2)；(12) 工程 (1) に記載されるように追加の 2 分間攪拌する；(13) マグネットを取り出し、溶液を翌日まで 25 で放置させる；そして (14) カルシウム感度を cP 粘度としてブルックフィールド LVT 粘度計で 60 rpm / 25 で測定する (サーモスタット制御水浴を用いる)。

【0086】

エステル化度決定法

ペクチンのエステル化度を下に示されるようにして決定できる。ペクチン試料 5 g を 0.1 mg ごく近くまで量り、適切なビーカーに移す。5 ml の 37 % 発煙塩酸と 100 ml の 60 % IPA との混合物と 10 分間攪拌する。取り付けたガラスフィルターチューブ (30 ~ 60 ml 容量) に移し、発煙 HCl - 60 % IPA 混合物 15 ml ずつで 6 回洗浄し、続いて、ろ液に塩化物がなくなるまで 60 % IPA により洗浄する。最後に、20 ml の 100 % IPA で洗浄し、炉中 105 で 2.5 時間乾燥させ、デシケーター中で冷却し、試料を量る。乾燥試料の全正味重量の厳密に 1 / 10 (元の未洗浄試料の 0.5 g を

示す)を250ml円錐フラスコに移し、試料を2mlのIPAで加湿する。新たに沸騰させ冷却させた蒸留水100mlをストッパーに添加し、完全な溶液が生成するまで時折渦巻を起こさせる。フェノールフタレインを5滴添加し、0.1N水酸化ナトリウムで滴定し、結果を初期滴定量(V_1)として記録する。

【0087】

20mlの0.5N水酸化ナトリウムをストッパーに添加し、激しく振とうし、15分間放置させる。厳密に20mlの0.5N塩酸を添加し、ピンク色が消えるまで振とうする。フェノールフタレインを3滴添加した後、0.1N水酸化ナトリウムで淡いピンク色に滴定すると、それは激しい振とう後も持続する；この値を鹼化滴定量(V_2)として記録する。

10

【0088】

円錐フラスコの内容物をケルダールトラップおよび水冷冷却器付きの500ml蒸留フラスコに定量的に移し、その送出チューブは、受フラスコ中の150mlの無二酸化炭素水と20mlの0.1N塩酸との混合物の表面下にまで延びる。蒸留フラスコに20mlの1-イン-10水酸化ナトリウム溶液を添加し、接続部を密封し、ついで過剰な発泡を避けるために慎重に加熱を始める。80~120mlの蒸留物が集められるまで加熱を続ける。2、3滴のメチルレッドを受フラスコに添加し、0.1N水酸化ナトリウムで過剰酸を滴定し、要求された容積(ml)を“S”として記録する。20mlの0.1N塩酸で空試験を実施し、要求された容積(ml)を“B”として記録する。アミド滴定量($B-S$)を V_3 として記録する。

20

【0089】

エステル化度(全カルボキシル基の%として)を下記公式により計算する：

$$DE = 100 \times \frac{V_2}{V_1 + V_2 + V_3}$$

カルシウム感度 Δ およびカルシウム率(CF)の決定法

ペクチン試料のカルシウム感度(ΔCS)における変化を下記のようにして決定できる。

【0090】

ペクチン水溶液を蒸留水中で調製し、そのpHを1M HClで1.5に調整する。用いられる濃度は0.60%前後とすべきである。このペクチン溶液を145gずつ粘度グラス中に量る。250mM塩化カルシウムを含む溶液5mlを145gのペクチン溶液に添加し、8.3mMカルシウムの最終濃度を与える。電磁攪拌機で十分攪拌しながら、1Mのアセートイオンを含むpH4.75のアセート緩衝液25mlをペクチン溶液に添加してpHを4.2にもっていく。

30

【0091】

マグネットを取り出し、グラスを翌日まで室温(25)で放置し、ついで粘度をブルックフィールド粘度計で25で測定する。

【0092】

本方法は、最大100の粘度を有するペクチン試料に最適であるが、200までの粘度のブルックフィールドユニットを良好な再現性で測定できる。高粘度を有するペクチン試料はゲル化する傾向があり、再現性の低い結果をもたらす。しかし、本方法は、試料の相対的なカルシウム感度の公正な表示を与える。

40

【0093】

同ペクチン試料の粘度を塩化カルシウムの添加なしで測定し、蒸留水で希釈するときは、ペクチンの ΔCS 値を無カルシウム溶液の測定粘度値をカルシウム含有溶液の測定粘度値から引いて計算する。CFは、無カルシウム溶液の測定粘度値をカルシウム含有溶液の粘度値に割って計算する。

【0094】

粒子沈降の決定

粒子沈降は、テストペクチンが添加される不溶性粒子を含む市販のジュース箱入り飲料の

50

試料を、16mmの外径(OD)を有する15カン高スクリー蓋締めチューブに入れることにより評価する。そのような飲料には、Frutopia Strawberry Passion、Libby Juicy Juice、Ocean Spray Orange Juice、Ocean Spray Ruby Red Grapefruit Juice、Snapple Island CocktailおよびTropicana Twisterが含まれる。

【0095】

テストペクチンの溶液(2%w/w)を調製し、飲料に添加して0.1重量%の最終濃度を達成する。チューブを3で冷蔵して4週間放置する。その時点で、粒子懸濁液上の透明な液体塔の高さを測定する。パーセント沈降を、透明層の高さ(H_c)をチューブ中の液体の全高(H_T)で割って下記のように計算する：

$$(H_c/H_T) \times 100$$

ペクチン製造の実施例

下に与える実施例1および2は、本発明の既知の脱エステルペクチンの調製を説明する。

実施例1

60%DEブロック脱エステルペクチンの製造

ブロック脱エステルペクチン(BDペクチン)を、未濃縮速ゲル化ペクチンジュースから製造する。

【0096】

未濃縮速ゲル化ペクチンジュースを、下記のようにして製造できる：

10kgの乾燥レモンピール(Argentina)を500リットル(有効容量)攪拌タンク反応器に添加する。0.8リットルの硝酸(62重量%の HNO_3 、米国コネチカット州06856、ノルウォーク、Olin Corp., Chemicals Group)をさらに反応器に添加して、0.9~1.2のpHに達する。ペクチンを、混合物をわずかな攪拌により3時間で70に加熱することによりレモンピールから抽出する。ついで、抽出混合物を、真空ろ過を用いてろ過し、Celite(Celite Corp., 米国カリフォルニア州93438、c/. World Minerals Inc., Lompoc)を用いて、真空磨きろ過が続く。ろ過物をワイブドフィルム蒸発器を用いて蒸発させ、溶液中のペクチン濃度をおよそ1.6%w/wに増大させる。透明ろ過物のpHを、炭酸ナトリウム溶液(Na_2CO_3 、米国ウィスコンシン州53201、1178、ミルウォーキー、CERAC, Inc.)の添加により4.0に調整する。

【0097】

この時点で速ゲル化ペクチン出発材料のDEは、およそ73%である。温度を45に調整し、pHを NH_3 で5.5に調整する。ペクチンメチルエステラーゼ(ノースカロライナ州28224、シャーロット、Gist-Brocades International B.V. 製造のCollupulin(登録商標)Liquid製品コード5045)を含む酵素をジュースに添加する。pHを2% NH_3 での滴定により一定に保つ。

【0098】

酵素を、pHを HNO_3 で2.5に下げることにより活性化し、温度を80に調整して10分間保持する。冷却後、ジュースを80%2-プロパノールに1:3で沈殿させ、60%2-プロパノールで洗浄する。ブロック脱エステル(BD)ペクチンを80/20IPA/水に沈殿させ、加圧して過剰IPA水を除去し、乾燥させる。

【0099】

ペクチンの分析は下記のとおりである：%DE = 59.8%；GA = 84.9；MW = 87000

実施例2

本発明の60%DEブロック脱エステルペクチンの製造

本発明のBDペクチンを製造する方法は、酵素工程をペクチンジュース蒸発後かつIPAによる沈殿に先立って付け加えることを除いて、実施例1の手順に見られるものと同じで

ある。酵素工程は、攪拌バイオ反応器段階のペクチンプロセスへの付加を必要とする。バイオ反応器段階において、ペクチンジュースの温度を30以下に冷却して、中性化に続くペクチン崩壊を最小限にする。次に、ペクチンジュースを、攪拌しながら重炭酸ナトリウムで5～7のpH値に調整する。ついで、ペクチンエステラーゼを添加してペクチンを脱エステルする。そのpHを、水酸化ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウムもしくは水酸化アンモニウムなどの塩基の添加により、脱エステルの間数時間維持する。反応の終わりで、混合物を4未満のpHに調整し、少なくとも85に加熱して酵素を活性化する。ついで、ペクチン溶液を沈殿に通常用いられる温度に冷却する。ブロック脱エステル(BD)ペクチンを80/20IPA/水に沈殿させ、加圧して過剰IPA水を除去し、乾燥させる。

10

【0100】

下に与える実施例3～6は、本発明の脱エステルペクチンが酸性水溶液中不溶性成分の懸濁を与えることを説明する。

実施例3

55%DEブロック脱エステルペクチンの製造

50gのBB Rapid Set Pectin 70.5%DE(デンマーク、DK-4623、Lille Skensved, Helcules Copenhagen Pectin製造)を5リットルの脱イオン水に75～80で溶解し、ペクチンが完全に溶解するまで攪拌することにより1%ペクチン溶液を調製する。50gの塩化アンモニウムをペクチン溶液に添加し、溶液を30～40に冷却する。pHを稀釈水酸化ナトリウム水溶液で7.0に調整する。2.5mlのペクチンメチルエステラーゼ(ノースカロライナ州28224、シャーロット、Gist-Brocades International B.V.製造のCollupulin(登録商標)Liquid製品コード5045)を溶液に添加する。溶液を1N水酸化アンモニウムで滴定し、pHを、ペクチンのDEが55%に達するまで、6.8～7.2に維持する。1N水酸化アンモニウムの使用量は、35.3mlだった。溶液のpHを稀釈HClでpH4に調整し、溶液を85に2～5分間加熱して酵素を活性化させる。ペクチン溶液を室温に冷却し、80/20IPA/水で沈殿させる。ペクチンを、細かいナイロンメッシュクロスに通して過することにより集め、材料を加圧して過剰IPA/水を除去する。ブロック脱エステル(BD)ペクチンをフード中で2～3時間予備乾燥させ、ついで真空炉中で16～20時間、50で真空下乾燥させる。乾燥BDペクチンを、Brinkman High Speed Ultracentrifugal Electric Grinder型2M-1上で1mm細孔サイズスクリーンを通して微粉碎する。

20

30

【0101】

下に与える実施例4～7は、本発明の脱エステルペクチンが酸性水溶液中不溶性成分の懸濁を与えることを説明する。

実施例4

オレンジジュース飲料のパルプ懸濁

473mlのオレンジジュース、フロリダ州34206、Tropicana Products Inc.製造のTropicana Pure Premium Orange Juiceを、1リットルピーカーにデカントする。ついで、47.3mlの1.5%ペクチン溶液(前記実施例2で調製されるような)を、急速攪拌機上で5分間攪拌しながらオレンジ飲料に添加する。

40

【0102】

1.135gのクエン酸カルシウム粉末(Spectrum Quality Products, Inc.製造のクエン酸カルシウムテトラハイドレートCA142食物級)を、混合しながら徐々にオレンジ飲料に添加する。混合をさらに10分間続け、pHを測定する。

【0103】

処理飲料を85で15分間低温殺菌する。ホット飲料を元のボトルに注ぎ戻し、蓋締め

50

をする。処理ボトルを室温に冷却し、ボトルを数回ひっくり返すことにより混合する。

【0104】

試料を、パルプ沈降の1ヶ月間観察し、ペクチン添加なしで調製した対照試料と比較する。2週間後、本発明のペクチンを有する試料は、有意な沈降が起こらなければ安定化されていると決定される。

実施例5

レモネードジュース飲料におけるパルプ懸濁

この実験に必要な材料は、以下のとおりである：実施例2で調製されるようなBDペクチンの1.5%溶液47.3ml；マサチューセッツ州02349、レイクビルミドルモア、Ocean Spray Cranberry Inc製造のOcean Spray Pink Lemonade 16オンスボトル；クエン酸カルシウム（粉末形で）（Spectrum Quality Products, Inc.製造のクエン酸カルシウムテトラハイドレートCA142食物級）；70 水浴；および急速攪拌機。

10

【0105】

Ocean Spray Pinkレモネードのボトルを1リットルビーカーに注入する。47.3mlの1.5%ペクチン溶液をレモネードに添加して、急速攪拌機で5分間混合する。ついで1.1353gのクエン酸カルシウムをレモネードに添加し、さらに10分間混合する。処理レモネードを85 で15分間低温殺菌し、元のボトルに戻す。沈降を未処理対照と比較する。

【0106】

結果は、ペクチン/カルシウム処理試料が室温で6ヶ月の貯蔵後ですら沈降しないことを示す（室温もしくは4 で24時間未満で沈降した未処理Ocean Spray Pinkレモネードと比較して）。

20

実施例6

ペクチンを有する30%および100%オレンジジュースでの粒子沈降速度

この実施例に必要な材料は、以下のとおりである：1つの16オンスカン（355ml）のTropicana, Season's Best、無パルプ冷凍オレンジジュース濃縮物（フロリダ州34206、ブラデントン、Tropicana Products Inc.製造）；実施例2で調製されるようなBDペクチン（60%DE）；500mlのストッパー付きパイレックス（登録商標）メスシリンダー；90 水浴；pHメーター；および10%砂糖水。

30

【0107】

この実施例で用いられる成分の量は、下記表1に与えられる：

【0108】

【表1】

オレンジジュースに用いられた成分の量 (ml)		
	30%ジュース	100%ジュース
濃縮物	106	355
1%ペクチン溶液 (0.15%)	212.85	212.85
10%水	1099.65 (砂糖水)	851.15 脱イオン水
合計	1419	1419

40

ペクチン溶液の測定量を適宜の容器に添加する。ジュース濃縮物と砂糖水および/または脱イオン水をペクチン溶液に添加する。混合物を、初めにペクチン溶液を容器の両側および底からスクラップすることによりゴムスパチュラで混合し、ついで混合物を、中位の速度で5分間急速攪拌により攪拌する。0.2%クエン酸カルシウムを、中位の速度でさらに10分間攪拌しながら、混合物に添加する。

【0109】

ジュースを50%クエン酸でpH3.6に滴定する。ついで、低温殺菌を85 で5分間

50

実施する。ホットジュースを500mlシリンダーに500mlマークまで注入し、シリンダーをただちにストッパーで蓋締めしてジュースを無菌に保つ。翌日、ジュースを、シリンダーを徐々にひっくり返すことにより混合する。

【0110】

結果は、30%および100%ジュースの両方においてパルプ粒子の沈降速度がペクチン無添加対照と比較して処理試料では60倍も遅いことを示す。

実施例7

栄養飲料におけるミネラル懸濁

この実験に用いられる栄養飲料は、Ultra Slim Fastである（フロリダ州33402、ウエストパームビーチ、Slim Fast Foods Co. 製造）。BDペクチンをSlim Fastに添加し、ペクチン無添加の対照と比較する。試料を、ミネラル懸濁安定度を決定するに十分な時間検査する。これは、温処理と冷処理により実施される。

10

【0111】

温処理とは、70～80℃でペクチンをホットSlim Fastに添加することをいう。冷処理とは、周囲温度でペクチンをSlim Fastに添加することをいう。

【0112】

Slim Fastの4つの試料をこの実験に用いる。温処理には2つの試料（試料1および2）が含まれる。試料1は、Ultra Slim Fast飲料である（フロリダ州33402、ウエストパームビーチ、Slim Fast Foods Co. 製造）。試料2は、Ultra Slim Fast飲料および本発明のブロックト脱エステル（BD）ペクチンである（実施例2で調製されるような）。

20

【0113】

冷処理には2つの試料（試料3および4）が含まれる。試料3は、Ultra Slim Fast飲料である（フロリダ州33402、ウエストパームビーチ、Slim Fast Foods Co. 製造）。試料4は、Ultra Slim Fast飲料および本発明のBDペクチンである（実施例2で調製されるような）。

【0114】

この実験を実施する手順は、以下のとおりである：1.5%BDペクチン溶液を、70～75℃でペクチンを脱イオン水に溶解することにより調製する。Silverson Mixerで5,000rpmで混合しながら、ペクチン溶液1部およびUltra Slim Fast飲料9部を注入し、0.15%の最終ペクチン濃度を作る。混合物のpHをpH3で阻止する。ついで、対照を、脱イオン水1部および栄養飲料9部で調製する。ペクチン安定剤のミネラル懸濁安定度を、十分な時間対照試料と比較する。

30

【0115】

本発明のペクチンを有する温および冷処理ならびに48時間後の対照試料の結果を、下記表2に示す。

【0116】

【表2】

温処理	冷処理
対照試料1：ミネラルの沈降が容器の底で観察される	対照試料3：観察される沈降物が、温処理で観察されるそれよりも少ない
対照試料2（ペクチン）：ミネラルが沈降せず懸濁したまま	対照試料4（ペクチン）：ミネラルが懸濁したまま

40

前記実施例を、前記実施例で用いられるものの代わりに本発明に総称的かつ具体的に記載される構成成分および/または操作条件を用いることにより同類の成功をもって繰り返すことができる。前記記載から、当業者は、本発明の基本的な特徴を容易に確かめることができ、その精神および範囲から逸脱することなく、本発明の種々な変化および改変を実施

50

して種々な用途および条件に適合できる。

【 0 1 1 7 】

2 0 0 0 年 6 月 9 日に出願された米国出願第 0 9 / 5 8 9 , 8 8 7 号は、本出願はその国際出願であるが、その内容すべてが本明細書に取り込まれる。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96590 A2(51) International Patent Classification: C12P 19/04,
C08B 37/06, A23L 1/0324, A61K 31/715, C12N 9/14

(31) International Application Number: PCT/US01/18555

(22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(36) Priority Data: 09/589,887 9 June 2000 (09.06.2000) US

(71) Applicant: CP KELCO APS [DK/US]; 1313 North Market Street, Wilmington, DE 19894 0001 (US).

(72) Inventors: LUZIO, Gary; 18 Barley Court, Newark, DE 19702 (US); FORMAN, Susan; 408 Vanier Drive, Newark, DE 19711 (US); GERRISH, Timothy; 23 Turkey Hollow Road, Kennet Square, PA 19348 (US).

(74) Agents: TURK, Arnold; (Heimlum & Bernstein, P.L.C.), 1941 Roland Clarke Place, Reston, VA 20191 et al. (US).

(81) Designated States (national): AB, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GG, GR, GU, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OL, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MT, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IL, IT, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG).

Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/96590 A2

(54) Title: DEESTERIFIED PECTINS, PROCESSES FOR PRODUCING SUCH PECTINS, AND STABILIZED ACIDIC LIQUID SYSTEMS COMPRISING THE SAME

(57) Abstract: Enzymatically blocked deesterified pectins that display pseudoplasticity and substantially no phase separation in aqueous solutions comprising at least one polyvalent cation, and processes for producing the same. Enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes. Processes for suspending particulates using enzymatically blocked-deesterified pectins. Enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated methoxyl pectins with enzymes. Compositions and stabilized aqueous systems containing enzymatically blocked deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

**DEESTERIFIED PECTINS, PROCESSES FOR PRODUCING
SUCH PECTINS, AND STABILIZED ACIDIC LIQUID
SYSTEMS COMPRISING THE SAME**

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

5 The present application expressly incorporates by reference herein the entire disclosure of U.S. Application No. 09/589,888, entitled "Low Methoxyl Pectins, Processes Thereof, and Stabilized Aqueous Systems Comprising the Same" and is also related to U.S. Application No. 09/684,968, filed October 10, 2000.

BACKGROUND OF THE INVENTION

1. Field of the Invention

10 The present invention is directed to enzymatically blocked-deesterified pectins that display pseudoplasticity and substantially no phase separation in an aqueous solution comprising at least one polyvalent cation, and processes for producing the same. In particular, the present invention is directed to enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes. The present invention is also directed to processes for suspending particulates using enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes. Furthermore, the present invention relates to stabilized aqueous systems containing enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes.

2. Background of the Invention and Related Art

20 The problem encountered with drinks containing insoluble components, such as pulps, essential oils, and the like, is the tendency of the insoluble components to separate, e.g., via sedimentation or creaming.

25 In order to maintain insoluble components in suspension, xanthan has been added to fruity drinks to raise the viscosity or alter the rheology of the drink. Xanthan, when added to aqueous solutions even at low concentrations, exhibits very strong pseudoplasticity and viscoplasticity at low concentration without any evidence of thixotropy. However, xanthan adds negative organoleptic perception (undesirable mouth-feel) in beverages. Thus, there is a need to provide a suspension aid that has the desired properties of xanthan without the undesired mouth-feel.

30 Alginates and pectins have been used in beverages to raise viscosity since they do not add negative mouth feel. Alginates and pectins useful for this application, however, tend to undergo

WO 01/96590

PCT/US01/08555

synchrosis during long term storage. Attempts have been made to use pectins as suspension aids with reduced syneresis properties, but without success.

Pectin is a structural polysaccharide commonly found in the form of protopectin in plant cells. The backbone of pectin comprises α -1-4 linked galacturonic acid residues which are interrupted with a small number of 1,2 linked α -L-rhamnose units. Some of the carboxyl groups of the galacturonic residues are esterified, typically by methyl groups. The remaining residues are present as free carboxyl groups. Esterification of the carboxyl groups occurs in the plant tissue after polymerization of the galacturonic acid residues. However, it is extremely rare for all of the carboxyl groups to be esterified. Usually, the degree of esterification varies from 0 to 90% of the available carboxylic groups.

The term "degree of esterification" is intended to mean the extent to which free carboxylic acid groups contained in the polygalacturonic acid chain of the pectin have been esterified (e.g., by methylation) or in other ways rendered non-acidic (e.g., by amidation).

Pectin is available as either low methoxyl pectin (LMP) or high methoxyl pectin (HMP). Low methoxyl pectin as defined here has a degree of esterification (DE) of less than about 45% and is highly reactive with cations such as calcium. High methoxyl pectin as defined here has a DE of greater than about 45% and typically is less reactive with polyvalent cations such as calcium.

The structure of the pectin, in particular the degree of esterification, dictates many of its physical and/or chemical properties. For example, pectin gelation caused by the presence of calcium cations depends especially on the degree of esterification. Gelation is believed to result from the calcium ions forming cross-linked complexes with free carboxyl groups of a number of pectin chains causing the formation of a continuous three-dimensional gelled matrix.

Pectin, as first extracted, has a relatively high degree of esterification of about 70-75%. Such pectin is ideal for use in jam and jellies. However, other uses require the preparation of pectins with different setting characteristics. This can be accomplished by modifying pectin to reduce the degree of esterification. One common process for achieving this is an acid hydrolysis. Alternative processes are directed to the use of alkali at low temperatures, ammonia, or to use a pectin methyl esterase.

During deesterification, the ester groups on the pectin can be removed in a random or blockwise manner. When the ester groups are removed from any galacturonic acid residues on more than one of the pectin chains non-sequentially, they are referred to as being deesterified in

WO 01/96590

PCT/US01/08555

a "random manner." When the ester groups are removed either at non-reducing ends or next to free carboxyl groups by a single-chain mechanism in a sequential manner, they are referred to as being deesterified in a "blockwise manner," as blocks of unesterified galacturonic acid units are created. The sequential or blockwise removal esters are typically mediated by pectin methyl esterases. The unesterified galacturonic acid units formed by blockwise deesterification are highly reactive to polyvalent cations such as calcium. Pectins having such blocks of unesterified galacturonic acid are said to be "calcium sensitive."

It is well known that the methyl content of pectin is modified in nature by plant pectin esterases that are present in the plant tissue. Many of these plant esterases, usually called pectin methyl esterases (PMEs), demethylate esterified carboxylic groups that are next to at least two contiguous free carboxylic acid groups. The demethylation proceeds in this way forming blocks. For example, the unpurified proteases papain and bromelain from plant tissue are also known to contain pectin methyl esterases as contaminants that demethylate pectins in a blockwise manner.

To a small extent these blocks of unesterified galacturonic acid units occur naturally in commercial high DE pectins when first isolated. In a commercial, pectin having a typical degree of esterification of approximately 68-74%, the length of the free carboxylic blocks may vary from molecule to molecule, and each pectin molecule typically includes several blocks of different lengths. For example, it is known that the distribution of the free carboxyl groups along the polymer chain is important for determining whether the pectin is suitable for use as a stabilizer for acidified milk drinks. It has been proposed that pectin can stabilize a suspension of casein particles by adsorbing onto the surface of the casein particles at specific points of the pectin molecule where the block-deesterified regions occur. To obtain complete stability of a significant proportion of the surface of a casein particle should be covered by the pectin. Nevertheless, aside from stabilizing casein these pectins have found limited utility for stabilization of pulp or other materials in typical beverage applications.

Pectins that have been randomly deesterified have also been tested for use in stabilization of particles in liquid foods and beverages. Commercial pectins that have been reduced randomly to low-methoxyl pectins can also be reactive with polyvalent cations such as calcium. Calcium is the most common source of polyvalent cations for food gel applications involving these types of pectins. Gelation is due to the formations of intermolecular junction zones between homogalacturonic acid units. Because of the electrostatic nature of the bonds, pectin gels are very sensitive to conditions that can modify the environment of the carboxyl groups through which the

WO 01/96590

PCT/US01/08555

calcium ion is linked to a neighboring pectin molecule. The gel forming ability of pectin increases with decreasing DE, and low methoxyl pectins with a large number of free carboxyl groups are very sensitive to low calcium levels. As the number of free carboxyl groups along the pectin backbone increase, the sensitivity to calcium increases. However, a typical problem associated with the increasing sensitivity of low DE pectin to calcium is an increased tendency for the pectin to gel and to display syneresis. The properties of gel contraction and syneresis in these types of randomly deesterified pectins are unsuitable for stabilization of particles in liquid foods and beverages.

Other, attempts have been made in the industry to use pectin as a suspending aid. For example, U.S. Patent No. 5,866,190 issued to Barey discloses compositions for stabilizing a non-milk drink containing insoluble components comprising a pectin and alginate. The pectin of Barey can be amidated or non-amidated HMPs and LMPs. These compositions however display syneresis that is undesirable for this application. It is also essential that the pectin/alginate mixture be dissolved in an aqueous medium in the absence of free calcium ions or that a calcium complexing agent be used. The complexing agent is added either to the pectin/alginate solution or to the fruit juice.

WO 97/03574 from Christensen relates to a process for stabilizing proteins in an acidic environment with a high-ester pectin prepared by a recombinant DNA technique. The high-ester pectin of Christensen has a degree of esterification of about 70 to 80%. However, the high-ester pectin of Christensen is not pseudoplastic in aqueous solution at low concentrations and is of limited value as a suspension aid.

In view of the above, there is an existing need for a pectin suspension aid that has shear thinning behavior for use in aqueous food, cosmetic, and pharmaceutical products.

There is also an existing need for a pectin to produce a stable aqueous system with shear thinning behavior (pseudoplasticity) and acceptable mouth-feel for use as a particle suspending aid. Pseudoplasticity is a rheological behavior most desired for stabilization of particles in aqueous solution. An aqueous solution is characterized as being pseudoplastic if it displays decreasing viscosity with increasing shear rate. A "stable aqueous system" refers to an aqueous system that can maintain stable viscosity without the formation of gels or without phase separation and syneresis. "Stable viscosity" or "stability" refers to the maintenance of the insoluble components in suspension and the homogeneity of the suspension initially formed. Rheologically,

WO 01/96590

PCT/US01/08555

the pseudoplasticity of the aqueous system is stable for a time period of at least one to twelve months or longer.

In addition, there is also an existing need for a pectin that does not undergo syneresis upon storage or form a separate gel phase even in the presence of relatively high levels of calcium such as 500 mM.

SUMMARY OF THE INVENTION

In view of the foregoing, one aspect of the invention is directed to enzymatically blocked-deesterified pectins that display pseudoplasticity and substantially no gel-contraction in aqueous solutions comprising at least one polyvalent cation, and processes for producing the same. In particular, the present invention is directed to enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes.

The enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention preferably has a degree of esterification from about 45 to 65%, and more preferably from about 55 to 59%.

The enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention preferably has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 5 to 25%, and more preferably from about 8 to 15%.

The enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention is preferably prepared by treating isolated high methoxyl pectin with enzyme. The enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of apples, apricots, avocados, bananas, berries, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, peaches, pears, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes, preferably papain.

The enzymatically blocked-deesterified pectin preferably has a degree of esterification from about 45 to 65% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%, and more preferably a degree of esterification from about 55 to 59% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%. The isolated high methoxyl pectin preferably has a degree of esterification greater than about 60%, and more preferably greater than about 67%. The isolated high methoxyl pectin is preferably in an aqueous form or powder form.

The isolated high methoxyl pectin is preferably obtained from at least one of citrus peels, apple juices, apple ciders, apple pomade, sugar beets, sunflower heads, vegetables or waste

WO 01/96590

PCT/US01/08555

products from plants selected from at least one of apples, sugar beet, sunflower and citrus fruits, and more preferably from at least one of limes, lemons, grapefruits, tangerines and oranges.

The enzymatically blocked-deesterified pectin of is preferably prepared by treating the isolated high methoxyl pectin with an enzyme, wherein the enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of apples, apricots, avocados, bananas, berries, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, peaches, pears, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes.

In addition, the present invention is also directed to processes for suspending insoluble particles which comprises adding enzymatically blocked-deesterified pectins to acidic liquid system. The enzymatically blocked-deesterified pectin preferably has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 5 to 25%.

The process for suspending particles of the present invention further comprises adding calcium ions to the acidic liquid system. The amount of calcium ions is preferably from about 10 ppm to about 2000 ppm, more preferably from about 50 ppm to about 1000 ppm, and most preferably from about 200 ppm to about 600 ppm.

The acidic liquid system can comprise proteins selected from at least one of soy, whey, and casein.

The process for suspending insoluble components of the present can further comprise adding a food, cosmetic, or pharmaceutical product to the acidic liquid system.

Furthermore, the present invention relates to stabilized aqueous systems containing (a) at least one enzymatically blocked-deesterified pectin that displays pseudoplasticity and substantially no phase separation in an aqueous solution comprising at least one polyvalent cation; and (b) at least one acidic liquid solution. The stabilized system can further comprise adding calcium ions to the acidic liquid solution. The amount of calcium ions is preferably from about 10 ppm to about 2000 ppm, and more preferably from about 50 ppm to about 600 ppm.

The acidic liquid solution of the stabilized system comprises proteins selected from at least one of soy, whey, and casein. The acid liquid solution can further comprise a food, cosmetic, or pharmaceutical product to the acidic liquid solution. The food product comprises at least one of fruit and vegetable. The acidic liquid solution can also comprise calcium ions.

Accordingly, it would be desirable to be able to provide a pectin for use in suspending insoluble components in acidic liquid systems that: (1) has shear thinning properties; (2) has shear

WO 01/96590

PCT/US01/08555

thinning properties with acceptable mouth-feel; (3) cannot undergo syneresis upon storage or form a separate gel phase in the presence of relatively high levels of calcium; and (4) minimal changes in rheology during long term storage; (5) be effective at low use levels.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 The present invention is directed to enzymatically blocked-deesterified pectin that displays pseudoplasticity and substantially no phase separation in an aqueous solution comprising at least one polyvalent cation at low use levels.

 Pseudoplasticity is a rheological behavior most desired for stabilization of particles in aqueous solution. An aqueous solution is characterized as being pseudoplastic if it displays
10 decreasing viscosity with increasing shear rate. This is also referred to as "shear thinning." This behavior is thought to be due to the formation a network structure caused by entanglement of the long chain molecules in solution. Pseudoplastic behavior of pectin is closely related to the relative size of the pectin molecules in solution. Higher molecular weight pectins exhibit this behavior at lower pectin concentrations. One approach toward increasing apparent molecular size is to
15 introduce calcium reactive sites to the high methoxyl pectin molecule by acid deesterification and to add calcium to the solution that forms cross-links between pectin molecules. However, this leads to the formation of gel particles and syneresis and these pectins typically also exhibit thixotropic behavior in solution when calcium is present.

 The calcium reactive pectins of this invention have a unique property of pseudoplastic
20 behavior at very low pectin concentrations without gel-contraction or syneresis and are non-thixotropic. In addition, these properties are maintained upon storage at room temperature under acidic conditions.

 "Phase separation" refers to the formation of a clear liquid above a suspended bed of particles, often with a clear boundary line. Phase separation could also be referred to as particle
25 sedimentation for the aqueous system containing the pectin of the present invention. Severe phase separation is characterized by clear liquid surrounding the particle bed on the sides as well as the bottom. Phase separation can include, but is not limited to, particle sedimentation and/or gel contraction. "Syneresis" is another term, often used with firm gels and not fluid gels, which is essentially the same as gel contraction, and is yet another representation of phase separation. The
30 test for determining phase separation is described below in the example section labeled "Determination of Particle Sedimentation", which is used to determine phase separation for particle sedimentation.

WO 01/96590

PCT/US01/18555

"Substantially no phase separation" refers to less than 10% of phase separation in the cationic aqueous solution containing the enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention. The phase separation of the enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention is preferably at most about 10%, more preferably at most about 7%, even more preferably about 5%, and at most about 3%.

The enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention is also non-thixotropic in aqueous solutions when reacted with calcium ions or other a polyvalent cations. That is, the enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention aids the aqueous solutions to rebuild viscosity or recover very quickly when shear is removed. The rebuild in viscosity after shear is applied is essential identical to the value for the viscosity before shear is introduced.

In addition, although the enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention does not substantially display phase separation in an aqueous solution comprising at least one polyvalent cation, it does react with polyvalent cations to form molecules of larger apparent molecular size that aids in entanglement for pseudoplasticity at low pectin concentrations. Examples of polyvalent cations preferably include, but are not limited to, aluminum ions, iron ions, manganese ions, calcium ions, and magnesium ions, more preferably calcium ions and magnesium ions, and most preferably calcium ions.

The amount of the polyvalent cation present in the aqueous solution is preferably in the amount of about 10 ppm to about 2,000 ppm, and more preferably about 50 ppm to about 1,000 ppm.

The amount of the calcium ions present in the aqueous solution is preferably in the amount of about 10 ppm to about 2,000 ppm, more preferably about 50 ppm to about 1,000 ppm, and most preferably about 200 ppm to about 600 ppm.

The enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention preferably has a calcium sensitivity (CS) greater than about 200 centipoise (cP) or a calcium fraction (CF) greater than 20, and a Δ degree of esterification (Δ DE) from about 5 to 25%. More preferably, the enzymatically blocked-deesterified pectin has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium sensitive pectin fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 7 to 25%. Most preferably, the enzymatically blocked-deesterified pectin has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium sensitive pectin fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 8 to 15%.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

"Calcium sensitivity (CS)" refers to the property of a pectin product related to an increase in the viscosity of a solution of the pectin product under appropriate conditions. "Calcium fraction (CF)" refers to a ratio of calcium sensitivities. Methods for determination of CS and CF are described in the Analytical Procedures in the Example Section below.

5 As discussed above, the term "degree of esterification" is intended to mean the extent to which free carboxylic acid groups contained in the polygalacturonic acid chain of the pectin have been esterified (e.g., by methylation) or in other ways rendered non-acidic (e.g., by amidation). "Δ degree of esterification (ΔDE)" refers to the difference in the DE between the pectins before enzymatic deesterification as compared to the pectin after enzymatic deesterification. See
10 methods for determination of DE and ΔDE.

In one embodiment of the present invention, the enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention is prepared from a high methoxyl pectin starting material with at least one enzyme. The enzyme may be present upon purification of the pectin, but other embodiments include removal, inactivation or the use of immobilized enzymes. A most preferred embodiment
15 involves the inactivation of the enzyme before precipitation in alcohol.

"Pectin starting material" is intended to mean a pectin product obtained by separation of pectin from a plant material. The pectin starting material can preferably be obtained from citrus peels, apple juices, apple ciders, apple pomade, sugar beets, sunflower heads, vegetables or waste products from plants such as apples, sugar beet, sunflower and citrus fruits, more preferably
20 apples, sugar beets and citrus plants, and most preferably citrus plants such as limes, lemons, grapefruits, and oranges.

The pectin starting material can, for example, be the acid pectin extract after purification or it could be wet pectin cake obtained after treating the acid pectin solution with alcohol. Further, the pectin starting material can, for example, be the dried or partly dried pectin in the pectin cake
25 from precipitation, or it could be the dried, milled pectin powder as normally produced by pectin manufacturers.

As indicated above, the process in accordance with the present invention comprises deesterifying the pectin starting material with at least one enzyme to produce enzymatically blocked-deesterified pectin. The pectin starting material of the present invention preferably has
30 a degree of esterification greater than about 60%, more preferably greater than about 65%, and most preferably greater than about 67%.

WO 01/96590

PCT/US01/18555

In one embodiment of the present invention, if the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is preferably from about 68 to 72%, then the degree of esterification of the enzymatically blocked-deesterified pectin is preferably from about 45 to 65%, more preferably from about 50 to 62%, and most preferably from about 55 to 59%.

5 In another embodiment of the present invention, the degree of esterification of the high DE pectin starting material is preferably from about 5 to 25% higher than the enzymatically blocked-deesterified pectin, more preferably from about 5 to 15% higher than the enzymatically blocked-deesterified pectin, and most preferably from about 8 to 15% higher than the enzymatically blocked-deesterified pectin.

10 The isolated high methoxyl pectin prepared as above is then subjected to a mild controlled deesterifying treatment using a pectin deesterifying enzyme such as pectin methyl esterase isolated from plant materials or organisms capable of producing such enzymes. Examples include but are not limited to the crude enzymes that can contain pectin methyl esterase such as papain, ficin or bromelain. These pectin methyl esterase enzymes deesterify pectins to form blocks of free carboxyl groups.

15 In one embodiment, a 1 to 2% aqueous solution of the isolated high methoxyl pectin is prepared from dry high DE pectin using appropriate heat and agitation to ensure complete dissolution of the pectin. Then sufficient sodium chloride is added to the preparation to achieve a 1% w/v concentration of sodium chloride based on the original volume of water used in the preparation of the pectin solution. Sodium chloride is known to enhance the activity of pectin deesterifying enzymes. The temperature of this solution is then adjusted to between 20 to 50°C depending upon the temperature optimum of the deesterifying enzyme used. The pH of the solution is then adjusted to about 5 to 8 using 0.5 M sodium hydroxide (NaOH). Finally, an appropriate amount of the pectin deesterifying enzyme is added to the pectin solution such as any of those produced by the methods described above in order to achieve controlled deesterification.

20 In the present invention, the ester groups on the pectin are removed in a sequential fashion, preferably by a deesterifying enzyme. Deesterifying enzymes or pectin methyl esterases are pectin enzymes that deesterify pectin to produce free carboxyl groups and free methanol. Deesterifying enzymes in the preferred embodiment deesterify pectins in blockwise manner (sequential fashion).
30 "Blockwise" or "sequential" deesterification occurs when deesterifying enzymes attack pectins either at non-reducing ends or next to free carboxyl groups and then proceed along the pectin

WO 01/96590

PCT/US01/18555

molecules by a single-chain mechanism, thereby creating blocks of nonesterified galacturonic acid units.

The pectin methyl esterase is extracted from plant tissues selected from, but not limited to, at least one of apples, apricots, avocados, bananas, berries, figs, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, peaches, pears, pineapple, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes. The enzyme may also be a mixture of more than one pectin methyl esterase from different sources or may also contain other enzymes that act on pectin.

In one preferred embodiment, the enzyme is extracted from papayas. More preferably the enzyme is papain. Most preferably, the enzyme is Colipulin® Liquid product code 5045 manufactured by Gist-Brocades International B.V., Charlotte, N.C. 28224.

The pH of the reaction solution is maintained at about 7 by continuous addition of 0.5 M NaOH. The up-take of NaOH by the solution is used to monitor the progress of the deesterification reaction. Once the deesterification has proceeded to the required degree to produce a pectin in accordance with the invention, the reaction is terminated by the addition of acid to reduce the pH of the solution to 4 or less. The reaction mixture is then heated to approximately 75 °C for 15 minutes to deactivate the enzyme followed by cooling of the mixture. The enzyme treated pectin can then be recovered from the solution by adding an equal volume of 60-80% IPA. The insoluble pectin is collected, pressed and washed with additional volumes of IPA and finally pressed to 30-50% by weight of dry matter.

The enzymatically block-deesterified pectin can further be dried and milled to small particles. Drying of the pectin can be accomplished by any technique in the art (e.g., atmospheric or reduced-pressure ovens) to a moisture content of less than about 50%, preferably less than about 25%. The drying temperature should be maintained below the temperature at which the pectin starts to lose its properties, e.g., color, molecular weight, etc. Any milling technique in the art can be used to mill the pectin product to the desired particle size. It is most preferred that the final product be in dry, powder form, with a moisture content of about 12 wt. % or less. "Dry powder form" is intended to mean that the product be pourable without substantial caking. The preferred final product is in the form of a powder for ease of use.

The process for preparing the deesterified pectin of the present invention can be prepared in a continuous process or a single batch, preferably in a continuous process. In accordance with the present invention, the enzymatically blocked-deesterified pectin can be used in a process for

WO 01/96590

PCT/US01/08555

suspending insoluble components in an acidic liquid system. The process includes adding the deesterified pectin that has been deesterified in a sequential pattern to an acidic liquid system.

"Insoluble components" refer to any insoluble particulates such as pulps, essential oils, coloring agents such as natural or otherwise, minerals, botanicals, and pharmaceuticals that have the tendency to phase separate in one or more places in a solution via sedimentation, creaming or other such destabilization mechanisms. The test for phase separation in the context of the present invention is described below in the example section labeled "Determination of Particle Sedimentation" which is a test for phase separation for particle sedimentation.

"Acidic liquid system or acidic aqueous system" herein refers to acidic food, cosmetic, and pharmaceutical products in liquid form, which contain a suitable concentration of polyvalent cations or to which polyvalent cations can be added. Examples of liquid food products preferably include, but are not limited to, drinks containing fruits, vegetables, or mixtures thereof, soups, salad dressings, and sauces. The acidic drink can be non-carbonate or carbonate, consumed undiluted or diluted, sweetened or unsweetened, salted or unsalted, with or without alcohol, or combinations thereof.

Examples of liquid acidic cosmetic products include, but are not limited to, perfumes, sun tan lotions, sun screen lotions, body lotions, deodorants, antiperspirants, conditioners and shampoos. Examples of liquid acidic pharmaceutical products include, but are not limited to, cough syrups, liquid forms of headache medicines, liquid forms of decongestants, and liquid forms of anti-inflammatory medicines.

The pH of the acidic liquid system in the process of the present invention is from about 2.0 to about 5, preferably from about 2.5 to about 4.5, and more preferably from about 3 to about 4.

The acidic liquid system can have a solid content from about 0.1% to about 50% by weight, preferably from about 1 to about 30 % by weight, and more preferably from about 5 to about 20 % by weight.

In one embodiment of the present invention, the acidic liquid system is a beverage drink that can have a solid content from about 0.1% to about 50% by weight, an alcohol content of between from about 0% to about 5% by volume, a salt (NaCl) content of about 0% to 3%, and a sugar content of from about 0.1% to about 15%.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

The weight ratio, of the enzymatically blocked-deesterified pectin to the acidic liquid system in the process of the present invention, can be from about 0.0001 to about 0.03, preferably from about 0.0005 to about 0.006, and more preferably from about 0.0015 to about 0.035.

The total amount, of enzymatically blocked-deesterified pectin in the acidic liquid system, can be from about 0.15% to about 0.35% by dry weight, preferably from about 0.05% to about 0.6% by dry weight, and more preferably from about 0.1% to 0.3 % by dry weight.

The aqueous system must also contain calcium ions or other polyvalent cations and thus the addition of calcium ions is not optional unless calcium is already present from another ingredient such as a calcium-fortifying agent.

Calcium ions react with the pectin as described in this invention to form a weak gel network of very low but stable viscosity that is pseudoplastic, non-thixotropic and stable at low concentrations. In addition this calcium-pectin solution shows no signs of syneresis. These properties are of particular value to the manufacturer who is seeking to fortify beverages and pharmaceutical products with calcium for nutritional purposes. Calcium levels of about 1000 ppm (i.e., micrograms calcium ion per gram of acidic liquid food) can be achieved without adverse effects on the ability to stabilize particles. This level of calcium addition to a 12 fluid ounce beverage represents a significant amount of the RDA (Recommended Daily Allowance) for calcium for an adult as recommended by the FDA (Food and Drug Administration).

The "stable viscosity" or "stability" that calcium ions provide to the acidic liquid system refers to the maintenance of insoluble components in suspension and the homogeneity of the suspension initially formed. Stability also means that the rheology of the acidic liquid system is stable for a time period of at least one to twelve months or longer.

Calcium ions used in the process of the present invention can be in a solid salt form or solution. Examples of calcium salts include, but are not limited to, calcium chloride, calcium acetate, calcium propionate, calcium oxide, calcium carbonate, calcium citrate, calcium lactate, calcium malonate, calcium gluconate, and, preferably calcium chloride, calcium acetate, calcium propionate, calcium oxide, calcium carbonate, calcium citrate, calcium lactate, calcium malonate, and calcium gluconate, more preferably calcium citrate, calcium lactate, calcium malonate, and calcium gluconate.

The amount of calcium ions in the system can be from about 0.001% to about 0.2% (10 to 2000ppm), preferably from about 0.005% to about 0.1% (50 to 1000 ppm), and more preferably from about 0.02% to about 0.06% (200 to 600 ppm).

WO 01/96590

PCT/US01/18555

The weight ratio of the calcium ions to the enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention can be from about 0.001 to about 10, preferably from about 0.01 to about 1.0, and more preferably from about 0.03 to about 0.30.

5 The weight ratio of the enzymatically blocked-deesterified pectin, acidic liquid system, and food, cosmetic, or pharmaceutical product in the process of the present invention can be from about 0.0001 to about 0.03, preferably from about 0.0005 to about 0.006, and more preferably from about 0.0015 to about to about 0.035.

10 When the enzymatically blocked-deesterified pectin of the present invention is added to an acidic liquid, it provides minimal changes in rheology during long term storage. In addition, the pectin of the present invention has shear thinning properties with acceptable mouth-feel. The deesterified pectin of the present invention does not undergo syneresis (form gel contraction) upon storage or form a separate gel phase in the presence of relatively high levels of calcium.

15 The amount of the enzymatically blocked-deesterified pectin in the system of the present invention is from about 0.01% to about 3% by dry weight, preferably from about 0.05 to about 0.6%, and more preferably from about 0.10 to about 0.4%.

20 Examples of the acidic liquid of the present invention include, but are not limited to, ethanol and water, glycerol and water, and propylene glycol and water. Also in accordance with the present invention, the enzymatically blocked-deesterified pectin can be used in a stabilized acidic liquid system. The stabilized acidic liquid system of the present invention includes an enzymatically blocked-deesterified pectin and an acidic aqueous solution.

"Acidic liquid" herein refers to acidic food, cosmetic, and pharmaceutical products in aqueous form. Examples of liquid food products preferably include, but are not limited to, drinks containing fruits, vegetables, or mixtures thereof, soups, salad dressings and sauces. The acidic drinks can be non-carbonated or carbonate, consumed undiluted or diluted, sweetened or
25 unsweetened, salted or unsalted, with or without alcohol, or combinations thereof.

30 Examples of liquid acidic cosmetic products include, but are not limited to, perfumes, sun tan lotions, sun screen lotions, body lotions, deodorants, antiperspirants, conditioners and shampoos. Examples of liquid acidic pharmaceutical products include, but are not limited to, cough syrups, liquid forms of headache medicines, liquid forms of decongestants, and liquid forms of anti-inflammatory medicines.

The pH of the acidic aqueous solution of the present invention is from about 2.0 to about 5, preferably from about 2.5 to about 4.5, and more preferably from about 3 to about 4.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

The acidic aqueous solution can have a content from about 0.1% to about 50% by volume, preferably from about 1 to about 30% by volume, and more preferably from about 4 to about 18% by volume.

5 The acidic aqueous solution in the stabilized acidic liquid system is from about 2.5 to about 5, preferably from about 2.8 to about 4.5, and more preferably from about 3 to about 5.

In addition, the system can further include a food, cosmetic or pharmaceutical product. Alternatively, the system can further include (1) calcium ions and (2) a food, cosmetic or pharmaceutical product.

10 The weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions in the stabilized acidic liquid system is from about 0.001 to about 0.2, preferably from about 0.005 to about 0.01, and more preferably from about 0.02 to about 0.06.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, using the preceding description, utilize the present invention to its fullest extent.

15 The following preferred specific embodiments are, therefore, to be construed as merely illustrative, and not limitative of the remainder of the disclosure in any way whatsoever.

EXAMPLES

Examples 1-6 provided below, illustrate different physical properties of the deesterified pectin known in the art and the deesterified pectin of the present invention, as well as processes of preparing and using the same. Also illustrate below are analytical procedures for determining
20 physical properties of the deesterified pectins.

Analytical Procedures

Method for Measuring Calcium Sensitivity

Calcium sensitivity can preferably be calculated by measuring calcium sensitivity (CS) of pectin in a solution with gum. Specifically, calcium salt and pectin are mixed at low pH where
25 there is no strong setting of calcium ions and pectin. Then the reaction between pectin and calcium ions is started by addition of sodium acetate/acetic acid buffer. The apparatus used in this calculation are: (1) plate magnetic stirrer (IKA MAG EOA 9); (2) magnetic stirrer (JK. IKA-Combimag REO); (3) 50 x 110 mm viscosity glass (Holm & Halby); (4) 25 ml dispenser; (5) 5 ml automatic pipette; (6) Brookfield viscosimeter LVT; (7) pH-meter; (8) technical balance; (9)
30 analytical balance; (10) 42mm TRIKA magnets; and (11) cooling bath (thermostatically controlled at 25°C)

WO 01/96590

PCT/US01/08555

The reagents used in this calculation are (1) 1.000 M HCl; (2) 1 M acetate buffer at pH 4.75 (68.04g/l of 500 mM CH₃COONa and 3H₂O, and 28.6 ml/l of 500 mM CH₃COOH (100%)); and (3) 250 mM calcium chloride (36.7550g/l CaCl₂ and 2H₂O). Ion exchanged water with a conductivity below 1.0 uS/cm must be used in all solutions. The pectin solution contains 400 g pectin solution with 2.4 g pure gum (0.6% sol.). If the testing sample is not 100% gum (pure gum), the sample is corrected using the following formula (A = the gum% of the sample):

$$(0.6 \times 400) / A = \text{g sample with } A\% \text{ gum for 400 g solution.}$$

The procedure for the calculating the calcium sensitivity is as follows: (1) weigh out the pectin with adjusted sugar percentage to 3 decimals; (2) disperse the pectin into 240 ml boiling ion-exchanged water in a high shear mixer; (3) pour the solution into a tared beaker with magnet; (4) pour additional 100 ml ion exchanged water into the mixer and add to the solution; (5) cool the pectin solution to about 25°C; (6) adjust the pectin solution to a pH of 1.5 with 1 M HCl; (7) weigh the solution to 400 g; (8) weigh out 145 g $\pm$ 1 g pectin solution in a viscosity glass; (9) put a TRIKA magnet in the glass; (10) add 5 ml 250 mM Ca⁺⁺ solution to the pectin solution while stirring with the plate magnetic stirrer at step (1). Stir for 2 min; (11) add 25 ml 1 M acetate buffer with dispenser to the glass while stirring with a magnetic stirrer (JK IKA-Combimag R50) (the pH is about 4.2); (12) stir for an additional 2 minutes as described in step (1); (13) remove the magnet and let the solution rest at 25°C until next day; and (14) measure calcium sensitivity as viscosity in cP with Brookfield LVT viscosimeter at 60 rpm/25°C (use the thermostatically controlled water bath).

Method for Determining Degree of Esterification

The degree of esterification of the pectin can be determined as presented below.

Weigh 5 g of the pectin sample to the nearest 0.1 mg and transfer to a suitable beaker. Stir for 10 minutes with a mixture of 5 ml of 37% fuming hydrochloric acid and 100 ml of 60% IPA. Transfer to a fitted glass filter tube (30 to 60 ml capacity) and wash with 6x 15 ml portions of the fuming HCl-60% IPA mixture, followed by 60% IPA until the filtrate is free of chlorides. Finally, wash with 20 ml of 100% IPA, dry for 2.5 hours in an oven at 105°C, cool in a desiccator and weigh the sample. Transfer exactly 1/10 of the total net weight of the dried sample (representing 0.5 g of the original unwashed sample) to a 250 ml conical flask and moisten the sample with 2 ml of IPA. Add 100 ml of recently boiled and cooled distilled water, stopper and swirl occasionally until a complete solution is formed. Add 5 drops of phenolphthalein, titrate with 0.1 N sodium hydroxide and record the results as the initial titre (V_i).

WO 01/96590

PCT/US01/08555

Add exactly 20 ml of 0.5 N sodium hydroxide, stopper, shake vigorously and let stand for 15 minutes. Add exactly 20 ml of 0.5 N hydrochloric acid and shake until the pink colour disappears. After adding 3 drops of phenolphthalein, titrate with 0.1 N sodium hydroxide to a faint pink colour which persists after vigorous shaking; record this value as the saponification titre (V_3).

- 5 Quantitatively transfer the contents of the conical flask into a 500-ml distillation flask fitted with a Kjeldahl trap and a water-cooled condenser, the delivery tube of which extends well beneath the surface of a mixture of 150 ml of carbon dioxide-free water and 20 ml of 0.1 N hydrochloric acid in a receiving flask. To the distillation flask add 20 ml of a 1-in-10 sodium hydroxide solution, seal the connections, and then begin heating carefully to avoid excessive
- 10 foaming. Continue heating until 80-120 ml of distillate has been collected. Add a few drops of methyl red to the receiving flask, and titrate the excess acid with 0.1 N sodium hydroxide, recording the volume (ml) required as "S". Perform a blank determination on 20ml of 0.1 N hydrochloric acid, and record the volume (ml) required as "B". Record the amide titre (B-S) as V_3 .

The degree of esterification (as % of total carboxyl groups) is calculated by the formula:

$$15 \quad DE = 100 \times \frac{V_2}{V_1 + V_2 + V_3}$$

Method for Determining Δ Calcium Sensitivity and Calcium Fraction (CF)

- 20 A change in the calcium sensitivity (ΔCS) of a pectin sample can be determined as presented below.

- An aqueous solution of the pectin is prepared in distilled water and its pH adjusted to 1.5 with 1 M HCl. The concentration used should be around 0.60%. 145g portions of this pectin solution are measured into viscosity glasses. 5 ml of a solution containing 250 mM calcium chloride is added to the 145 g pectin solution to give a final concentration of 8.3 mM calcium.
- 25 With efficient stirring with a magnetic stirrer, 25 ml of an acetate buffer containing 1 M of acetate ions and a pH of 4.75, is added to the pectin solution to bring the pH to 4.2.

The magnet is removed, and the glass is left at room temperature (25°C) until the next day, when the viscosity is measured at 25°C with a Brookfield viscometer.

- 30 While the method is most suitable for pectin samples having a viscosity not higher than 100, viscosity up to 200 Brookfield units can be measured with good reproducibility. Pectin samples with higher viscosity tend to gel, resulting in less reproducible results. The method, however, gives a fair indication of the relative calcium sensitivity of samples.

WO 01/96590

PCT/US01/18555

When the viscosity of the same pectin sample is measured without the addition of calcium chloride but diluted with distilled water, the ΔCS value of the pectin is calculated by subtracting the measured viscosity value for the calcium free solution from the measured viscosity value for the calcium containing solution. CF is determined by dividing the measured viscosity value for the calcium free solution into the viscosity value for the calcium containing solution.

Determination of Particle Sedimentation

Particle sedimentation is evaluated by placing samples of commercially available juice boxed beverages which contain insoluble particles to which the test pectins are added, into 15 can high screw capped tubes which have outside diameters (OD) of 16 mm. Examples of such beverages include Frutopia Strawberry Passion, Libby Juicy Juice, Ocean Spray Orange Juice, Ocean Spray Ruby Red Grapefruit Juice, Snapple Island Cocktail, and Tropicana Twister.

Solutions of the test pectins (2% w/w) are prepared and added to beverages to achieve a final concentration of 0.1 wt.%. The tubes are allowed to stand refrigerated at 3 °C for four weeks. At that point, the height of the clear liquid column above the particle suspension is measured. A percent sedimentation is calculated by dividing the height of the clear layer (H_c) by the total height (H_t) of the liquid in the tube (clear layer and pulp suspended) as shown below:

$$(H_c/H_t) \times 100$$

Examples of Pectin Production

Examples 1 and 3 provided below illustrate the preparation of known deesterified pectin of the present invention.

Example 1

Production of a 60% DE Block Deesterified Pectin

A block deesterified pectin (BD Pectin) is made from unconcentrated rapid-set pectin juice.

Unconcentrated rapid-set pectin juice can be made as follows:

10 kg of dried lemon peel (Argentina) is added to a 500 liter (working volume) stirred tank reactor. 0.8 liter of nitric acid (62 wt.% HNO₃, Olin Corp., Chemicals Group, Norwalk, CT 06856 USA) is further added to the reactor to reach a pH of 0.9 to 1.2. Pectin is extracted from the lemon peel by heating the mixture with slight agitation to 70 °C for 3 hours. The extraction mixture is then filtered using vacuum filtration followed by a vacuum polishing filtration using

WO 01/96590

PCT/US01/08555

Celite (Celite Corp., c/ World Minerals Inc. Lompoc, CA 93438 USA). The filtrate is evaporated using a wiped film evaporator to increase the pectin concentration in solution to approximately 1.6% w/w. The pH of the clear filtrate is adjusted to 4.0 by the addition of a sodium carbonate solution (Na₂CO₃, CERAC, Inc. Milwaukee, WI 53201 1178 USA).

5 The DE for the rapid-set pectin starting material at this point is approximately 73%. The temperature is adjusted to 45°C and pH is adjusted to 5.5 with NH₃. An enzyme that contains pectin methylsterase (Collupulin® Liquid product code 5045 manufactured by Gist-Brocades International B.V., Charlotte, N.C. 28224) is added to the juice. The pH is held constant by titration with 2% NH₃.

10 The enzyme is inactivated by lowering pH to 2.5 with HNO₃ and the temperature is adjusted to 80°C and held for 10 minutes. After cooling the juice is precipitated 1:3 in 80% 2-propanol and washed in 60% 2-propanol. The block-deesterified (BD) pectin is precipitated in 80/20 IPA/water, pressed to remove excess IPA water and dried.

Analysis of Pectin shows %DF = 59.8 %, GA= 84.9; and MW= 87000.

15

Example 2

Production of a 60% DE Block Deesterified Pectin of the Present Invention

The process for producing the BD pectin of the present invention is similar to that found in the procedures of Example 1 except an enzyme step is added after evaporation of the pectin juice and prior to precipitation with IPA. The enzyme step requires the addition of a stirred bio-reactor stage to the pectin process. In the bio-reactor stage, the temperature of the pectin juice is cooled to 30°C or less to minimize pectin degradation following neutralization. Next, the pectin juice is adjusted to pH value from 5 to 7 with sodium bicarbonate with stirring. Pectin esterase is then added to deesterify the pectin. The pH is maintained for several hours during the deesterification by the addition of a base such as sodium hydroxide, sodium bicarbonate, sodium carbonate, or ammonium hydroxide. At the end of the reaction, the mixture is adjusted to a pH of less than 4 and heated to at least 85°C to inactivate the enzyme. The pectin solution is then cooled to a temperature normally used for precipitation. The block-deesterified (BD) pectin is precipitated in 80/20 IPA/water, pressed to remove excess IPA water and dried.

25 Examples 3-6 provided below illustrate that the deesterified pectin of the present invention provides suspension of insoluble components in acidic aqueous solution.

Example 3

Production of a 55% DE Block Deesterified Pectin

WO 01/96590

PCT/US01/08555

Prepare a 1% pectin solution by dissolving 50 grams of BB Rapid Set Pectin 70.5 % DE (from Hercules Copenhagen Pectin, Lillo Skensved, Denmark, DK-4623) in 5 liters of deionized water at 75°C to 80°C and stirring until pectin is completely dissolved. 50 grams of ammonium chloride is added to the pectin solution and the solution is cooled to 30 to 40°C. The pH is adjusted to 7.0 with dilute aqueous sodium hydroxide. 2.5 ml of pectin methylsterase (Collupulin® Liquid product code 5045 manufactured by Gist-Brocades International B.V., Charlotte, N.C. 28224) is added to the solution. The solution is titrated with 1 N ammonium hydroxide and the pH is maintained between 6.8 and 7.2 until the DE of the pectin reaches 55%. The amount of 1 N ammonium hydroxide used was 35.3 ml. The pH of the solution is adjusted to pH4 with dilute HCl and the solution is heated to 85°C for 2 to 5 minutes to inactivate the enzyme. The pectin solution is cooled to room temperature and precipitated with 80/20 IPA water solution. The pectin is collected by filtering through fine nylon mesh cloth and the material is pressed to remove excess IPA/water. The block-deesterified (BD) pectin is pre-dried in a hood for 2-3 hours and then dried in a vacuum oven for 16-20 hours under vacuum at 50°C. The dried BD Pectin is milled through a 1 mm pore size screen on a Brinkman High Speed Ultracentrifugal Electric Grinder type 2M-1.

Examples 4-7 provided below illustrate that the deesterified pectin of the present invention provides suspension of insoluble components in acidic aqueous solution.

20

Example 4

Pulp Suspension in Orange Juice Drinks

473ml of orange juice, Tropicana Pure Premium Orange Juice from Tropicana Products, Inc., Fl. 34206 is decanted into a one-liter beaker. Then 47.3 ml of a 1.5% pectin solution (as prepared in Example 2 above) is added to the orange drink with stirring on a lightning stirrer for 5 minutes.

25

1.135g of calcium citrate powder (calcium citrate tetrahydrate CA142 food grade manufactured by Spectrum Quality Products, Inc.) is added slowly to the orange drink while mixing. The mixing is continued for another 10 minutes and the pH is measured.

The treated drink is pasteurized at 85°C for 15 minutes. The hot drink is poured back into the original bottle and capped. The treated bottle is cooled to room temperature and mixed by inverting the bottle several times.

30

WO 01/96590

PCT/US01/08555

The sample is observed for a one month period for settling of pulp and compared to a control sample that is prepared without adding pectin. After two weeks, the sample with the pectin of the present invention is determined to be stabilized if no significant settling has occurred.

Example 5

5 Pulp Suspension in Lemonade Juice Drinks

The materials required for this experiment are: 47.3 ml of 1.5% solution of BD pectin as prepared in Example 2; a 16-ounce bottle of Ocean Spray Pink Lemonade manufactured by Ocean Spray Cranberry Inc. LakevilleMiddlemore, Ma. 02349; calcium citrate (in powder form) (calcium citrate tetrahydrate CA142 food grade manufactured by Spectrum Quality Products, Inc.);
10 water bath at 70°C; and lightning stirrer.

The bottle of Ocean Spray Pink lemonade is poured into a 1 liter beaker. 47.3 ml of 1.5% of pectin solution is added to the lemonade and mixed with a lightning stirrer for 5 minutes. 1.1353 grams of calcium citrate is then added to the lemonade and mixed for an additional 10 minutes. The treated lemonade is pasteurized at 85°C for 15 minutes and placed back in its
15 original bottle. The settling is compared to an untreated control.

The results illustrate that the pectin/calcium treated sample does not settle even after 6 months storage at room temperature (as compared to untreated Ocean Spray Pink lemonade bottles which settled in less than 24 hours at room temperature or 4°C).

Example 6

20 Settling Rate of Particles at 30% and 100% Orange Juice with Pectin

The materials required for this example are: one 16oz can (355ml) of Tropicana, Season's Best, Pulp Free, frozen orange juice concentrate (manufactured by Tropicana Products Inc. Bradenton, FL 34206); BD Pectin (60% DE) as prepared in Example 2; 500ml Pyrex Graduated cylinders with stoppers; Water Bath at 90°C; pH Meter; and 10% Sugar Water.

25 The amount of ingredients used in this example is provided in Table 1 below:

WO 01/96590

PCT/US01/08555

Table I

Amount of Ingredients used for Orange Juice (ml):		
	30% Juice	100% Juice
Concentrate	106	355
1% Pectin Sol. (0.15%)	212.85	212.85
10% Water	1099.65 (Sugar Water)	851.15 Deionized Water
Total	1419	1419

The measured amount of pectin solution is added to a suitable container. Juice concentrate and sugar water/or deionized water is added to the pectin solution. The mixture is initially mixed with a rubber spatula by scrapping the pectin solution from the sides and bottom of the container, then the mixture is stirred by lightening stir at medium speed for 5 minutes. 0.2% Calcium Citrate is added to the mixture while stirring at medium speed for an additional 10 minutes.

The juice is titrated with 50% citric acid to pH 3.6. Pasteurization is then conducted at 85 °C for 5 minutes. The hot juice is poured into a 500ml cylinder to the 500ml mark, and the cylinder is immediately capped with a stopper to keep the juice sterile. The next day, the juice is mixed by slowly inverting the cylinder.

The result shows that the settling rate of pulp particles in both 30 and 100 percent juice is up to 60 times slower in the treated samples as compared to the control which contains no added pectin.

Example 7

Mineral Suspension in a Nutritional Beverage

The Nutritional Beverage used for this experiment is Ultra Slim Fast (manufactured by Slim Fast Foods Co., West Palm Beach, FL 33402). BD Pectin is added to the Slim Fast and is compared with Control with no added pectin. Samples are examined over a length of time to determine mineral suspension stability. This is done by Hot Treatment and Cold Treatment.

Hot Treatment refers to adding pectin in hot Slim Fast at 70 – 80 °C. Cold Treatment refers to adding pectin in Slim Fast at ambient temperature.

Four samples of Slim Fast are used in this experiment. The hot treatment includes two samples (Samples 1 and 2). Sample 1 is Ultra Slim Fast drink (manufactured by Slim Fast Foods Co. West Palm Beach FL 33402). Sample 2 is Ultra Slim Fast drink and blocked-deesterified (BD) pectin of the present invention (as prepared in Example 2).

WO 01/96590

PCT/US01/08555

The cold treatment includes two samples (Samples 3 and 4). Sample 3 is Ultra Slim Fast drink (manufactured by Slim Fast Foods Co. West Palm Beach FL 33402). Sample 4 is Ultra Slim Fast drink and BD pectin of the present invention (as prepared in Example 2).

The procedure for performing this experiment are as follows: 1.5% BD pectin solution is prepared by dissolving pectin in deionized water at 70-75°C. Pour 1 part of pectin solution and 9 parts of Ultra Slim Fast drink while mixing with a Silverson Mixer at 5,000 rpm to make a final pectin concentration of 0.15%. The pH of the mixture is checked to be at pH 3. The control is then prepared with 1 part of deionized water and 9 parts of Nutritional Beverage. The mineral suspension stability of the pectin stabilizer is compared with a Control Sample over a length of time.

The results for Hot and Cold Treatments with pectins of the present invention and Control Samples after 48 hours are shown in Table 2 below.

Table 2

	Hot Treatment	Cold Treatment
15	<i>Control Sample 1:</i> Sedimentation of the mineral is observed at the bottom of the container	<i>Control Sample 3:</i> Sediment observed is less than that observed with the Hot Treatment.
20	<i>Control Sample 2 (Pectin):</i> Mineral remains suspended without any settling.	<i>Control Sample 4 (Pectin):</i> Mineral remains suspended.

The preceding examples can be repeated with similar success by substituting the generically and specifically described constituents and/or operating conditions of this invention for those used in the preceding examples. From the foregoing descriptions, one skilled in the art can easily ascertain the essential characteristics of this invention, and without departing from the spirit and scope thereof, can make various changes and modifications of the invention to adapt to various usages and conditions.

U.S. Application No. 09/589,887, filed June 9, 2000, of which the present application is an International Application, is expressly incorporated by reference herein in its entirety.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An enzymatically blocked-deesterified pectin displaying pseudoplasticity and substantially no phase separation in aqueous solution comprising at least one polyvalent cation.
2. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 1, wherein the amount of
5 polyvalent ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.
3. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 2, wherein the polyvalent ion is selected from one of aluminum ions, iron ions, manganese ions, calcium ions, and manganese ions.
4. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 3, wherein the polyvalent
10 is calcium ion, and wherein the amount of calcium ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.
5. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 4, wherein the amount of calcium ion is from about 200 ppm to about 600 ppm.
6. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 1, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 10%.
- 15 7. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 6, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 5%.
8. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 7, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 3%.
9. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 1 having a degree of
20 esterification from about 45 to 65%.
10. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 9 having a degree of esterification from about 55 to 59%.
11. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 9 having a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of
25 esterification from about 5 to 25%.
12. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 11 having a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 8 to 15%.
13. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 1 prepared by treating
30 isolated high methoxyl pectin with enzyme.
14. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 13, wherein the enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of apples, apricots, avocados, bananas,

WO 01/96590

PCT/US01/08555

berries, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, peaches, pears, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes.

15. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 13, wherein the enzyme
5 is papain.

16. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 13 having degree of esterification from about 45 to 65% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%.

17. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 16 having degree of
10 esterification from about 55 to 59% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%.

18. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 13, wherein the isolated high methoxyl pectin has a degree of esterification greater than about 60%.

19. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 18, wherein the isolated
15 high methoxyl pectin has a degree of esterification greater than about 67%.

20. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 13, wherein the isolated high methoxyl pectin is in an aqueous form or powder form.

21. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 13, wherein the isolated high methoxyl pectin is obtained from at least one of citrus peels, apple juices, apple ciders, apple
20 pomade, sugar beets, sunflower heads, vegetables or waste products from plants selected from at least one of apples, sugar beet, sunflower and citrus fruits.

22. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 21, wherein the isolated high methoxyl pectin is obtained from at least one of limes, lemons, grapefruits, tangerines and oranges.

23. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 9 prepared by treating the isolated high methoxyl pectin with an enzyme, wherein the enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of apples, apricots, avocados, bananas, berries, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, peaches, pears, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes.

24. The enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 23 having degree of
30 esterification from about 45 to 65% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

25. A process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin which comprises treating at least one isolated high methoxyl pectin with at least one deesterifying enzyme, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin displays pseudoplasticity and substantially no phase separation in aqueous solution comprising at least one polyvalent cation.

5 26. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein the amount of polyvalent ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.

27. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 26, wherein the polyvalent is selected from one of aluminum ions, iron ions, manganese ions, calcium ions, and manganese ions.

10 28. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 27, wherein the amount of polyvalent is calcium ion, and wherein the amount of calcium ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.

29. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 28, wherein the amount of calcium ion is from about 200 ppm to about 600 ppm.

15 30. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 10%.

31. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 30, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 5%.

20 32. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 31, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 3%.

33. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein the enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of apples, apricots, avocados, bananas, berries, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, 25 peaches, pears, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes.

34. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein enzyme is papain.

30 35. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein the isolated high methoxyl pectin is obtained from at least one of citrus peels, apple juices, apple ciders, apple pomade, sugar beets, sunflower heads, vegetables or waste products from plants selected from at least one of apples, sugar beet, sunflower and citrus fruits.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

36. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 35, wherein the isolated high methoxyl pectin is obtained from at least one of limes, lemons, grapefruits, tangerines and oranges.

37. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 5 25, wherein the isolated high methoxyl pectin is in an aqueous form or powder form.

38. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein the isolated high methoxyl pectin has a degree of esterification greater than about 60%.

39. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 10 38, wherein the isolated high methoxyl pectin has a degree of esterification greater than about 67%.

40. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein if the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%, the degree of esterification of the enzymatically blocked-deesterified pectin is from about 15 45 to 65%.

41. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 40, wherein if the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%, the degree of esterification of the enzymatically blocked-deesterified pectin is from about 55 to 59%.

20 42. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25, wherein the isolated high methoxyl pectin is obtained from at least one of citrus peels, apple juices, apple ciders, apple pomade, sugar beets, sunflower heads, vegetables or waste products from plants selected from at least one of apples, sugar beet, sunflower and citrus fruits.

43. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 25 42, wherein the isolated high methoxyl pectin is obtained from at least one of limes, lemons, grapefruits, tangerines and oranges.

44. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 43, wherein the isolated high methoxyl pectin is in an aqueous form or powder form.

45. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 30 44, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 5 to 25%.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

46. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 45, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 8 to 15%.

5 47. The process for producing an enzymatically blocked-deesterified pectin of claim 46, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a degree of esterification from about 45 to 65%.

48. A process for suspending insoluble components in an acidic liquid system which comprises adding enzymatically blocked-deesterified pectin that has been deesterified with
10 enzyme to acidic liquid system, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin displays pseudoplasticity and substantially no phase separation in aqueous solution comprising at least one polyvalent cation.

49. The process of claim 48, wherein the amount of polyvalent ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.

15 50. The process of claim 49, wherein the polyvalent is selected from one of aluminum ions, iron ions, manganese ions, calcium ions, and manganese ions.

51. The process of claim 50, wherein the polyvalent is calcium ion, and wherein the amount of calcium ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.

52. The process of claim 51, wherein the amount of calcium ion is from about 200 ppm
20 to about 600 ppm.

53. The process of claim 48, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 10%.

54. The process of claim 53, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 5%.

25 55. The process of claim 54, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 3%.

56. The process of claim 48, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 5 to 25%.

30 57. The process of claim 56 further comprises adding calcium ions to the acidic liquid system.

WO 01/96590

PCT/US01/18555

58. The process of claim 57, wherein the amount of calcium ions is from about 10 ppm to about 2000 ppm.
59. The process of claim 58, wherein the amount of calcium ions is from about 50 ppm to about 1000 ppm.
- 5 60. The process of claim 59, wherein the amount of calcium ions is from about 200 ppm to about 600 ppm.
61. The process of claim 57, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.001 to about 0.2.
62. The process of claim 61, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.005 to about 0.01.
- 10 63. The process of claim 62, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.02 to about 0.06.
64. The process of claim 56, wherein the acidic liquid system comprises protein.
65. The process of claim 60, wherein the protein is at least one of soy, whey, and casein.
- 15 66. The process of claim 57 further comprises adding a food, cosmetic, or pharmaceutical product to the acidic liquid system, wherein the food product comprises at least one of fruit and vegetable.
67. The process of claim 48, wherein the acidic liquid system comprises calcium ions.
- 20 68. The process of claim 67, wherein the amount of calcium ions is from about 10 ppm to about 2000 ppm.
69. The process of claim 68, wherein the amount of calcium ions is from about 50 ppm to about 1000 ppm.
70. The process of claim 69, wherein the amount of calcium ions is from about 200 ppm to about 600 ppm.
- 25 71. The process of claim 67, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.005 to about 0.01.
72. The process of claim 71, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.02 to about 0.06.
- 30 73. The process of claim 72, wherein the acidic liquid system comprises protein.
74. The process of claim 67, wherein the acidic liquid system comprises protein, wherein the protein is at least one of soy, whey, and casein.

WO 01/96590

PCT/US01/18555

75. The process of claim 67 further comprising adding a food, cosmetic, or pharmaceutical product to the acidic liquid system.

76. The process of claim 75, wherein the food product comprises at least one of fruit and vegetable.

5 77. The process of claim 48, wherein the amount of the enzymatically esterified pectin is from about 0.01% to about 3.0% by dry weight in the final acidic liquid system.

78. The process of claim 77, wherein the amount of the enzymatically esterified pectin is from about 0.05% to about 0.6% by dry weight in the final acidic liquid system.

10 79. The process of claim 78, wherein the amount of the enzymatically esterified pectin is from about 0.15% to about 0.35% by dry weight in the final acidic liquid system.

80. The process of claim 48, wherein the pH of the acidic liquid system is from about 2.0 to about 5.

81. The process of claim 80, wherein the pH of the acidic liquid system is from about 2.5 to about 4.5.

15 82. The process of claim 81, wherein the pH of the acidic liquid system is from about 3 to about 4.

83. The process of claim 48, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20 cP, and a Δ degree of esterification from about 5 to 25%.

20 84. The process of claim 48, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin is prepared by deesterifying an isolated high methoxyl pectin with an enzyme, wherein the enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of apples, apricots, avocados, bananas, berries, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, peaches, pears, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes.

25 85. The process of claim 48, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin is prepared by deesterifying an isolated high methoxyl pectin with an enzyme, wherein the enzyme is papain.

30 86. The process of claim 48, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a degree of esterification from about 45 to 65% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

87. The process of claim 86, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a degree of esterification from about 55 to 59% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%.

5 88. A stabilized acidic liquid system comprising (a) at least one enzymatically blocked-deesterified pectin that displays pseudoplasticity and substantially no phase separation in aqueous solution comprising at least one polyvalent cation; and (b) at least one acidic liquid solution.

89. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the amount of polyvalent ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.

90. The stabilized acidic liquid system of claim 89, wherein the polyvalent is selected from one of aluminum ions, iron ions, manganese ions, calcium ions, and manganese ions.

91. The stabilized acidic liquid system of claim 90, wherein the polyvalent is calcium ion, and wherein the amount of calcium ion is from about 10 ppm to about 2,000 ppm.

92. The stabilized acidic liquid system of claim 91, wherein the amount of calcium ion is from about 200 ppm to about 600 ppm.

15 93. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 10%.

94. The stabilized acidic liquid system of claim 93, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 5%.

95. The stabilized acidic liquid system of claim 94, wherein the amount of phase separation in the aqueous solution is at most about 3%.

20 96. The stabilized acidic liquid system of claim 88 further comprises adding calcium ions to the acidic liquid solution.

97. The stabilized acidic liquid system of claim 96, wherein the amount of calcium ions is from about 10 ppm to about 2000 ppm.

25 98. The stabilized acidic liquid system of claim 97, wherein the amount of calcium ions is from about 50 ppm to about 600 ppm.

99. The stabilized acidic liquid system of claim 96, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.001 to about 0.2.

30 100. The stabilized acidic liquid system of claim 96, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.005 to about 0.01.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

101. The stabilized acidic liquid system of claim 100, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.02 to about 0.06.
102. The stabilized acidic liquid system of claim 96, wherein the acidic liquid solution comprises protein.
- 5 103. The stabilized acidic liquid system of claim 102, wherein the protein is at least one of soy, whey, and casein.
104. The stabilized acidic liquid system of claim 96 further comprises a food, cosmetic, or pharmaceutical product to the acidic liquid solution.
105. The stabilized acidic liquid system of claim 104, wherein the food product
10 comprises at least one of fruit and vegetable.
106. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the acidic liquid solution comprises calcium ions.
107. The stabilized acidic liquid system of claim 106, wherein the amount of calcium ions is from about 10 ppm to about 2000 ppm.
- 15 108. The stabilized acidic liquid system of claim 107, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.001 to about 0.2.
109. The stabilized acidic liquid system of claim 106, wherein the weight ratio of the enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.005 to about 0.01.
110. The stabilized acidic liquid system of claim 109, wherein the weight ratio of the
20 enzymatically deesterified pectin and the calcium ions is from about 0.02 to about 0.06.
111. The stabilized acidic liquid system of claim 110, wherein the amount of calcium ions is from about 50 ppm to about 1000 ppm.
112. The stabilized acidic liquid system of claim 106, wherein the acidic liquid solution comprises protein, wherein the protein is at least one of soy, whey, and casein.
- 25 113. The stabilized acidic liquid system of claim 106, further comprises adding a food, cosmetic, or pharmaceutical product to the acidic liquid solution.
114. The stabilized acidic liquid system of claim 113, wherein the food product comprises at least one of fruit and vegetable.
115. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the amount of the
30 enzymatically esterified pectin is from about 0.01% to about 3.0% by dry weight in the final acidic liquid solution.

WO 01/96590

PCT/US01/08555

116. The stabilized acidic liquid system of claim 115, wherein the amount of the enzymatically esterified pectin is from about 0.05% to about 0.6% by dry weight in the final acidic liquid solution.

117. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the pH of the acidic liquid solution is from about 2.5 to about 5.

118. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a calcium sensitivity greater than about 200 cP or a calcium fraction greater than 20, and a Δ degree of esterification from about 5 to 25%.

119. The stabilized acidic liquid system claim 88, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin is prepared by deesterifying an isolated high methoxyl pectin with an enzyme, wherein the enzyme is extracted from plant tissues selected from at least one of apples, apricots, avocados, bananas, berries, limes, grapefruits, mandarins, cherries, currants, grapes, mangos, papayas, passion fruits, peaches, pears, plums, beans, carrots, cauliflowers, cucumbers, leeks, onions, peas, potatoes, radishes and tomatoes.

120. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin is prepared by deesterifying an isolated high methoxyl pectin with an enzyme, wherein the enzyme is papain.

121. The stabilized acidic liquid system of claim 88, wherein the enzymatically blocked-deesterified pectin has a degree of esterification from about 45 to 65% when the degree of esterification of the isolated high methoxyl pectin is from about 68 to 72%.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/096590 A3(51) International Patent Classification: C12P 19/04
C08B 37/06, A23L 1/0524, A61K 31/715, C12N 9/14

(21) International Application Number: PCT/US01/08555

(22) International Filing Date: 8 June 2001 (08.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/589,887 9 June 2000 (09.06.2000) US

(71) Applicant: CP KELCO APS [DK/US]; 1313 North Market Street, Wilmington, DE 19894-0001 (US).

(72) Inventors: JAZJO, Gary; 18 Berley Court, Newark, DE 19702 (US); FORMAN, Susan; 408 Vaulter Drive, Newark, DE 19711 (US); GERRISH, Timothy; 73 Jockey Hollow Road, Kenne Square, PA 19546 (US).

(74) Agents: TI-RIK, Arnold, Greenblum & Bernstein, P.L.C., 1941 Richard Clarke Place, Reston, VA 20191 et al. (US).

(81) Designated States (optional): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GL, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LI, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (optional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report: 10 October 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/096590 A3

(54) Title: DEESTERIFIED PECTINS, PROCESSES FOR PRODUCING SUCH PECTINS, AND STABILIZED AQUEOUS LIQUID SYSTEMS COMPRISING THE SAME

(57) Abstract: Enzymatically blocked deesterified pectins that display pseudoplasticity and substantially no phase separation in aqueous solutions comprising at least one polyvalent cation, and processes for producing the same. Enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes. Processes for suspending particulates using enzymatically blocked-deesterified pectins enzymatically blocked deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes. Compositions and stabilized aqueous systems containing enzymatically blocked-deesterified pectins prepared by deesterifying isolated high methoxyl pectins with enzymes.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/18555
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12P19/04 C08B37/06 A23L1/0524 A61K31/715 C12N9/14		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC.		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A23L C08B C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Location of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 15830 A (DANISCO A/S) 23 March 2000 (2000-03-23) page 7, line 11 - line 26 page 11, line 16 -page 13, line 15	1-121
X	GB 2 342 921 A (ZYLEPSIS LIMITED) 26 April 2000 (2000-04-26) page 6, line 1 - line 7 page 10, line 12 - line 19 page 16, line 9 -page 17, line 13	1-121
☐ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see, e.g., line) "C" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" late document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be anticipated novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "M" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 August 2002		21/08/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 58, Harenstein 2 NL - 2580 HV Hilversum Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 661 600 01 Fax (+31-70) 340-1015		Authorized officer Lensen, H

Form PCT/ISA/210 (revised 01-02) (A/V 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/US 01/18555	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
WO 0015830 A	23-03-2000	AU 5644199 A	03-04-2000		
		CN 1326513 T	12-12-2001		
		EP 1114176 A1	11-07-2001		
		WO 0015830 A1	23-03-2000		
GB 2342921 A	26-04-2000	AU 6351199 A	15-05-2000		
		WO 0024921 A1	04-05-2000		

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42	A 2 3 L 2/00	L
C 1 2 P 19/04	A 2 3 L 2/26	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100092015

弁理士 桜井 周矩

(72) 発明者 ルズィオ, ゲイリー

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 7 0 2 , ニューアーク, バーリー・コート 1 8

(72) 発明者 フォアマン, スーザン

アメリカ合衆国デラウェア州 1 9 7 1 1 , ニューアーク, ヴァニアー・ドライブ 4 0 8

(72) 発明者 ガーリッシュ, ティモシー

アメリカ合衆国ペンシルバニア州 1 9 3 4 8 , ケネット・スクエア, ターキー・ホロー・ロード
2 3

F ターム(参考) 4B017 LC10 LE03 LE10 LG04 LK01 LK13 LL05 LP15

4B064 AF17 CA21 CB03 CE03 DA01 DA10 DA20

4C076 AA12 BB01 EE30Q EE41Q FF13 FF36

4C083 AD211 AD411 AD421 CC01 DD23 DD27 EE01

4C090 AA02 BA17 BC10 BD18 BD36 CA38 DA03 DA23 DA26 DA27