

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19)

**RU**

(11)

**2 668 396**

<sup>(13)</sup> **C2**

(51) МПК

*C12N 9/10* (2006.01)

*C12N 9/96* (2006.01)

*A23L 29/00* (2016.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*A23L 29/06* (2006.01); *C12N 9/1044* (2006.01); *C12Y 203/02013* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2014121318, 31.10.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
31.10.2012

Дата регистрации:  
28.09.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
01.11.2011 FI 20116074

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2015 Бюл. №  
34

(45) Опубликовано: 28.09.2018 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 02.06.2014

(86) Заявка РСТ:  
FI 2012/051048 (31.10.2012)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2013/064736 (10.05.2013)

Адрес для переписки:  
107061, Москва, Преображенская площадь, д.  
6, ООО "Вахнина и Партнеры"

(72) Автор(ы):

РАДЖАКАРИ Кирси (FI),  
ХОТАКАЙНЕН Кай (FI),  
МИЛЛЁРИНЕН Пейви (FI)

(73) Патентообладатель(и):  
ВАЛИО Лтд (FI)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: US2003190399 A1, 09.10.2003.  
US2011064847 A1, 17.03.2011. EP 1543732 A1,  
22.06.2005. EP 2251421 A1, 17.11.2010. US  
5340734 A, 23.08.1994. YU-JEN YU ET AL.  
"Overproduction of soluble recombinant  
transglutaminase from *Streptomyces netropsis*  
in *Escherichia coli*", Applied microbiology and  
biotechnology, 2008, v.81, no.3, p.523-532.  
BRADBURY S. L. ET (см. прод.)

C2  
C6  
C9  
C3  
C8  
C9  
C2

R  
U  
2  
6  
6  
8  
3  
9  
6  
C  
2

## (54) ЖИДКИЙ ФЕРМЕНТНЫЙ СОСТАВ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к биотехнологии и пищевой промышленности. Предложены жидкий ферментный состав для пищевых продуктов и способ его получения. По меньшей мере один фермент, сивающий и/или модифицирующий молочный белок, выбранный из трансглутаминазы, тирозиназы или белковой глутаминазы, добавляют к суспензии полиол-вода, содержащей от 25 до 100% (мас./мас.), и значение pH суспензии доводят пищевой кислотой

(кислотами) до значения в диапазоне от 4,4 до 5,1 до или после добавления фермента, и, необязательно, добавляют консервант. Полученный жидкий ферментный состав сохраняет свою ферментативную активность и микробиологическую чистоту без каких-либо консервантов в составе при температурах в холодильнике и/или в морозильной камере в течение 50 и более дней. 2 н. и 12 з.п. ф-лы, 18 пр.

(56) (продолжение):

AL. "Glycerol as an Enzyme-Stabilizing Agent: Effects on Aldehyde Dehydrogenase", Proceedings of the National Academy of Sciences, 1972, v.69, no.9, p.2373-2376. RU 2425581 C2, 10.08.2011.

R U 2 6 6 8 3 9 6 C 2

R U 2 6 6 8 3 9 6 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19)

**RU** (11)

**2 668 396**<sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.  
*C12N 9/10* (2006.01)  
*C12N 9/96* (2006.01)  
*A23L 29/00* (2016.01)

FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A23L 29/06* (2006.01); *C12N 9/1044* (2006.01); *C12Y 203/02013* (2006.01)

(21)(22) Application: 2014121318, 31.10.2012

(24) Effective date for property rights:  
31.10.2012

Registration date:  
28.09.2018

Priority:

(30) Convention priority:  
01.11.2011 FI 20116074

(43) Application published: 10.12.2015 Bull. № 34

(45) Date of publication: 28.09.2018 Bull. № 28

(85) Commencement of national phase: 02.06.2014

(86) PCT application:  
FI 2012/051048 (31.10.2012)

(87) PCT publication:  
WO 2013/064736 (10.05.2013)

Mail address:  
107061, Moskva, Preobrazhenskaya ploshchad, d.  
6, OOO "Vakhnina i Partnery"

(72) Inventor(s):

RAJAKARI Kirsi (FI),  
HOTAKAINEN Kai (FI),  
MYLLARINEN Paivi (FI)

(73) Proprietor(s):

VALIO Ltd (FI)

R  
U  
2  
6  
6  
8  
3  
9  
6  
C  
2  
C  
6  
6  
9  
3  
8  
6  
9  
2  
U  
R

R  
U  
2  
6  
6  
8  
3  
9  
6  
C  
2

**(54) LIQUID ENZYME FORMULATION AND PROCESS FOR ITS PREPARATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; food industry.

SUBSTANCE: group of inventions relates to biotechnology and the food industry. Liquid enzyme formulation for food products and a process for its preparation are disclosed. At least one enzyme that cross-links and/or modifies milk protein selected from transglutaminase, tyrosinase or protein glutaminase is added to a polyol-water suspension containing from 25 to 100% (w/w) and pH of the suspension is adjusted

with a food acid(s) to a value in the range of 4.4 to 5.1 before or after addition of the enzyme, and optionally a preservative is added.

EFFECT: resulting liquid enzyme formulation retains its enzymatic activity and microbiological purity without any preservatives in the formulation at temperatures in the refrigerator and/or in the freezer for 50 or more days.

14 cl, 18 ex

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Изобретение относится к жидкому ферментному составу, в частности к жидкому и стабильному составу, включающему в себя сшивающий фермент и/или фермент, модифицирующий молочные протеины. В частности настоящее изобретение относится к жидкому и стабильному трансглутаминазному составу. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения жидкого ферментного состава.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Ферментные составы, включающие в себя сшивающий фермент и/или фермент, модифицирующий молочные протеины, такие, как лакказу, тирозиназу, пероксидазу, сульфгидрилоксидазу или глюкозооксидазу, имеются в продаже как в порошковых, так и в жидких составах. Тем не менее, трансглутаминазные и белково-глутаминазные препараты в настоящее время представлены на рынке только в порошковой форме. Использование порошкового ферментного препарата не является полностью приемлемым, ввиду формирования пыли на всех производственных предприятиях. В особенности, обеспокоенность среди работников вызвали риски для здоровья людей вследствие запыления.

[0003] Трансглутаминаза, полученная из штамма *Streptoverticillium mobaraense*, и технология ее получения описываются в Европейском патенте №0 379 606 B1. Кроме того, способ производства трансглутаминазы с помощью гена, выделенного из штамма *Streptomyces lydicus*, описывается в Европейском патенте №0 777 726 B1.

[0004] Одной из проблем, связанных с получением такого фермента, как трансглутаминаза, в жидкой форме, является недостаток стабильности состава. Кроме того, один из недостатков, связанных с имеющимися на текущем уровне техники жидкими ферментными составами, заключается в том, что они содержат, по меньшей мере, один консервант.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Задачей настоящего изобретения является, таким образом, обеспечение жидкого ферментного состава, включающего в себя трансглутаминазу и/или иной фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок, такой, как лакказу, тирозиназу, пероксидазу, сульфгидрилоксидазу, глюкозооксидазу или белковую глутаминазу, который является стабильным и может храниться в течение периода времени, ожидаемого от коммерческого состава, при комнатной температуре или при температурах в холодильнике и/или в морозильной камере.

[0006] Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение жидкого состава, включающего в себя трансглутаминазу, который является стабильным и может храниться в течение периода времени, ожидаемого от коммерческого состава, при комнатной температуре или при температурах в холодильнике и/или в морозильной камере.

[0007] Еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение способа получения стабильного, жидкого ферментного состава, включающего в себя трансглутаминазу и/или иной фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок.

[0008] Далее, еще одной задачей настоящего изобретения является обеспечение способа получения стабильного, жидкого состава, включающего в себя трансглутаминазу.

[0009] Задачи изобретения реализуются посредством составов и способов, изложенных далее в независимых пунктах формулы изобретения. Предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения описываются в зависимых пунктах формулы

изобретения.

[0010] Прочие задачи, подробная информация и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из последующего подробного описания и примеров.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 [0011] Ферменты, сшивающие и/или модифицирующие молочный белок, такие, как трансглутаминаза, лакказа, тирозиназа, пероксидаза, сульфигидрилоксидаза и белковая глутаминаза, катализируют модификации молочного белка. Видимо, существует взаимное усиление действия этих ферментов и, далее, - действия глюкозооксидазы. Без привязки к какой-либо теории, глюкозооксидаза и/или пероксидаза, кажется, 10 катализирует реакции, где кислород высвобождается посредством формирования перекиси водорода. Затем кислород может катализировать (окислять) сшивку тирозиназы.

15 [0012] Ферменты, сшивающие и/или модифицирующие молочный белок, такие, как трансглутаминаза, лакказа, тирозиназа, пероксидаза, сульфигидрилоксидаза и белковая глутаминаза, необязательно - вместе с глюкозооксидазой, используются в производстве переработанных рыбных, мясных и яичных продуктов, макаронных изделий и паштетов, фруктов, ягод и овощей, соевых продуктов, зерновых продуктов, хлеба и хлебобулочных изделий.

20 [0013] Кроме того, ферменты, сшивающие и/или модифицирующие молочный белок, повсеместно важны в пищевой переработке молочной или иной пищевой продукции.

[0014] Трансглутаминазы относятся к семейству ферментов (КФ 2.3.2.13), которые катализируют образование ковалентных связей между глютаминовыми и лизиновыми аминокислотными остатками в белковых молекулах. После образования связей высвобождается аммиак.

25 [0015] К примеру, лакказы (КФ 1.10.3.2), полученные из грибков и бактерий, таких как грибки *Trametes hirsute*, катализируют сшивку между углеводородами и белками (окисление ароматических соединений и цистеина), применяются в переработке пищевых продуктов для снижения числа аллергенов.

30 [0016] К примеру, тирозиназы (КФ 1.14.18.1) - это ферменты, которые катализируют окисление таких фенолов, как тирозин, применяются в переработке пищевых продуктов для снижения числа аллергенов.

[0017] К примеру, пероксидазы (КФ 1.11.1.7) - это семейство ферментов, которые катализируют окисление ароматических соединений, применяются в переработке пищевых продуктов для снижения числа аллергенов.

35 [0018] Сульфигидрилоксидаза (КФ 1.8.3.3) катализирует формирование дисульфидных связей, окисление глутатиона.

[0019] Белковая глутаминаза катализирует дезамидирование белково связанного глютамина, и глютамин преобразуется в глутаминовую кислоту.

40 [0020] Глюкозооксидаза катализирует формирования белковых сшивок и окислительное желатинирование пентозанов.

[0021] Ферменты, сшивающие и/или модифицирующие молочный белок, такие, как трансглутаминаза, лакказа, тирозиназа, пероксидаза, сульфигидрилоксидаза и белковая глутаминаза, используются в молочной промышленности для стабилизации структуры молочных продуктов. В дополнение к молочной промышленности, эти ферменты

45 используются в производстве переработанных рыбных, мясных и яичных продуктов, макаронных изделий и паштетов, фруктов, ягод и овощей, соевых продуктов, зерновых продуктов, хлеба и хлебобулочных изделий. Соответственно, к примеру, жидкий ферментный состав подходит для производства молочных продуктов, переработанных

рыбных, мясных и яичных продуктов, макаронных изделий и паштетов, фруктов, ягод и овощей, соевых продуктов, зерновых продуктов, хлеба и хлебобулочных изделий. Использование жидкого ферментного препарата было бы более целесообразным и выгодным, нежели использование порошкового состава, особенно в промышленных масштабах производства.

[0022] Трансглутаминазы особенно активны в диапазоне значений pH от 5,2 до 8.

Если сжиженная трансглутаминаза хранится при pH, равном 5,2, или при pH, равном 8, фермент быстро становится неактивным. После хранения трансглутаминазы при значении pH, равном 5,2, в течение 7 дней при комнатной температуре или при

10 температуре в холодильнике, активность падает наполовину.

[0023] Изобретение основывается на том факте, что, когда трансглутаминаза, тирозиназа или белковая глутаминаза хранится в суспензии такого полиола, как глицерин или сорбит, и воды в диапазоне значений pH от 4,4 до 5,1, ее активность сохраняется умеренно во время хранения при комнатной температуре и - превосходно

15 во время хранения при температуре в холодильнике и/или в морозильной камере. Кроме того, изобретение основывается на том факте, что, когда трансглутаминаза вместе с белковой глутаминазой хранится в суспензии глицерина и воды при значении pH в 4,6, активность ферментов сохраняется умеренно во время хранения при комнатной температуре и - превосходно во время хранения при температуре в холодильнике и/или

20 в морозильной камере. Далее, изобретение основывается на том факте, что, когда трансглутаминаза вместе с белковой глутаминазой и тирозиназой хранится в суспензии глицерина и воды при значении pH в 4,6, активность ферментов сохраняется умеренно во время хранения при комнатной температуре и - превосходно во время хранения при температуре в холодильнике и/или в морозильной камере. Кроме того, жидкие препараты

25 в соответствии с настоящим изобретением также являются микробиологически стабильными во время хранения при комнатной температуре и при температуре в холодильнике и/или в морозильной камере. Кроме того, было неожиданно обнаружено, что жидкий ферментный состав в соответствии с настоящим изобретением сохранял свою ферментную активность и микробиологическую чистоту (без микробного роста)

30 без каких-либо консервантов в составе при температурах в холодильнике и/или в морозильной камере.

[0024] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения жидкий ферментный состав суспензии пол иол-вода имеет значение pH в диапазоне от 4,4 до 5,1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения значение pH

35 ферментного состава находится в диапазоне от 4,4 до 4,8. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения значение pH ферментного состава равно 4,4. В другом варианте осуществления настоящего изобретения значение pH ферментного состава равно 4,6. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения значение pH ферментного состава равно 4,8. Далее, еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения значение pH ферментного состава равно 5,1.

[0025] Полиолы, такие, как глицерин, сорбит, ксилит и/или манит, можно использовать в жидким ферментном составе в соответствии с настоящим изобретением. Также можно использовать смеси полиолов, такие, как смеси глицерина и других полиолов.

[0026] Суспензия полиола и воды или смесь из двух или более полиолов и воды, 45 подходящая для получения ферментного препарата в соответствии с настоящим изобретением, может включать в себя такой(ие) полиол(ы), как глицерин, сорбит, ксилит и/или маннит от 25% до 100%, предпочтительно - от 50% до 100% (массовая доля). В одном варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в

суспензии 25% полиола/75% воды (массовая доля). В другом варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в суспензии 50% полиола/50% воды (массовая доля). Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в суспензии 75% полиола/25% воды (массовая доля).

- 5 [0027] Суспензия глицерина и воды, подходящая для получения ферментного препарата в соответствии с настоящим изобретением, может содержать глицерина от 25% до 100%, предпочтительно - от 50% до 100%. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в суспензии 25% глицерина/75% воды. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в
- 10 суспензии 50% глицерина/50% воды. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в суспензии 75% глицерина/25% воды. Кроме того, суспензия сорбита и воды, подходящая для получения ферментного препарата в соответствии с настоящим изобретением, может содержать сорбита от 25% до 100%, предпочтительно от 50% до 100%. В одном варианте осуществления настоящего
- 15 изобретения фермент растворяется в суспензии 25% сорбита/75% воды. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в суспензии 50% сорбита/50% воды. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в суспензии 75% сорбита/25% воды.

- [0028] Значение pH суспензии можно регулировать до требуемого диапазона с
- 20 помощью кислоты, одобренной для использования в пищевой промышленности, такой, как молочная кислота, ГДЛ (глюконо-дельта-лактон), лимонная кислота, уксусная кислота, щавелевая кислота, яблочная кислота, пантотеновая кислота, пропионовая кислота и/или хлористоводородная кислота, или каких-либо их смесей/сочетаний в виде кислоты или соли. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения
- 25 молочная кислота используется для регулировки значения pH.

- [0029] Жидкий ферментный препарат в соответствии с настоящим изобретением может необязательно содержать такой консервант, как Na-бензоат. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения жидкий ферментный препарат в соответствии с настоящим изобретением не содержит каких-либо дополнительных
- 30 консервантов, т.е. состав получается без консервантов. В другом варианте осуществления настоящего изобретения жидкий ферментный препарат в соответствии с настоящим изобретением содержит дополнительный консервант. Далее, в другом варианте осуществления настоящего изобретения жидкий ферментный препарат в соответствии с настоящим изобретением содержит Na-бензоат в качестве консерванта.
- 35 Далее, еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения жидкий ферментный препарат в соответствии с настоящим изобретением содержит Na-бензоат в количестве от 0,1 до 1%, предпочтительно - в количестве 0,7% в качестве консерванта.

- [0030] Жидкий ферментный препарат в соответствии с настоящим изобретением сохраняет свою активность при комнатной температуре в течение приблизительно двух
- 40 недель, в холодильнике - в течение приблизительно от 1,5 до шести месяцев, по меньшей мере, и в морозильной камере - от 5 месяцев до 24 месяцев.

- [0031] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения жидкий состав включает в себя один фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок. В другом варианте осуществления настоящего изобретения жидкий состав включает в
- 45 себя два или несколько ферментов, сшивающих и/или модифицирующих молочный белок. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ферментом, сшивающим и/или модифицирующим молочный белок, в составе в соответствии с настоящим изобретением является трансглутаминаза. В другом варианте осуществления

настоящего изобретения ферментом, сшивающим и/или модифицирующим молочный белок, в составе в соответствии с настоящим изобретением является тирозиназа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментом, сшивающим и/или модифицирующим молочный белок, в составе в соответствии с настоящим

изобретением является белковая глутамина. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, в составе в соответствии с настоящим изобретением являются трансглутамина и белковая глутамина. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, в составе в

соответствии с настоящим изобретением являются трансглутамина и тирозиназа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, в составе в соответствии с настоящим изобретением являются трансглутамина и лакказа. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или

модифицирующими молочный белок, в составе в соответствии с настоящим изобретением являются трансглутамина, белковая глутамина и лакказа. Далее, еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, в составе в соответствии с настоящим изобретением являются трансглутамина, белковая глутамина и тирозиназа.

[0032] Настоящее изобретение относится также к способу получения жидкого ферментного состава, где фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок, добавляется в суспензию полиол-вода, имеющую значение pH в диапазоне от 4,4 до 5,1. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения значение pH суспензии полиол-вода регулируется до значения в диапазоне от 4,4 до 5,1. В одном из

вариантов осуществления настоящего изобретения значение pH суспензии полиол-вода регулируется до значения в диапазоне от 4,4 до 4,8. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения значение pH ферментного состава регулируется до 4,4. В другом варианте осуществления настоящего изобретения значение pH суспензии полиол-вода регулируется до 4,6. Далее, в другом варианте осуществления настоящего

изобретения значение pH суспензии полиол-вода регулируется до 4,8. Далее, еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения значение pH ферментного состава регулируется до 5,1.

[0033] Суспензия полиола и воды, подходящая для способа в соответствии с настоящим изобретением, может содержать пол иол а от 25% вплоть до 100% (массовая доля). В одном варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в 25% суспензии полиол-вода. В другом варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в 50% суспензии полиол-вода. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения фермент растворяется в 75% суспензии полиол-вода. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения полиолом является глицерин. В другом варианте осуществления настоящего изобретения полиолом является сорбит.

[0034] В данном способе значение pH суспензии можно регулировать до требуемого диапазона с помощью кислоты, одобренной для использования в пищевой промышленности (пищевых кондиций, признанной полностью безвредной), такой как молочная кислота, ГДЛ, лимонная кислота, уксусная кислота, щавелевая кислота, яблочная кислота, пантотеновая кислота, пропионовая кислота и/или хлористоводородная кислота, или каких-либо их смесей/сочетаний в виде кислоты или соли. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения молочная кислота

используется в способе в соответствии с настоящим изобретением для регулировки значения рН.

[0035] В способе в соответствии с настоящим изобретением, кроме того, консервант, такой, как Na-бензоат, может необязательно включаться в жидкий ферментный состав.

5 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением не включает в себя добавление консерванта. В другом варианте осуществления настоящего изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением включает в себя добавление консерванта. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения способ в соответствии с настоящим

10 изобретением включает в себя добавление Na-бензоата в качестве консерванта. Далее, еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением включает в себя добавление Na-бензоата в количестве от 0,1 до 1%, предпочтительно - в количестве 0,7% в качестве консерванта.

[0036] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения способ в 15 соответствии с настоящим изобретением включает в себя следующие этапы:

а) значение рН суспензии полиол-вода регулируется с помощью пищевых(ой) кислот(ы) до значения в диапазоне от 4,4 до 5,1

б) фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок, добавляется в суспензию

20 в) необязательно добавляется консервант.

[0037] Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения способ в соответствии с настоящим изобретением включает в себя следующие этапы:

а) фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок, добавляется в суспензию полиол-вода

25 б) значение рН суспензии регулируется с помощью пищевых(ой) кислот(ы) до значения в диапазоне от 4,4 до 5,1

в) необязательно добавляется консервант.

[0038] В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения один фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок, добавляется в суспензию. В

30 другом варианте осуществления настоящего изобретения два или более фермента, сшивающих и/или модифицирующих молочный белок, добавляются в суспензию. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения ферментом, сшивающим и/или модифицирующим молочный белок, является трансглутаминаза. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментом, сшивающим и/или

35 модифицирующим молочный белок, является тирозиназа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментом, сшивающим и/или модифицирующим молочный белок, является белковая глутаминаза. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, являются трансглутаминаза и белковая

40 глутаминаза. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, являются трансглутаминаза и тирозиназа. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, являются трансглутаминаза и лакказа. Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения ферментами,

45 сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, являются трансглутаминаза, белковая глутаминаза и лакказа. Далее, еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения ферментами, сшивающими и/или модифицирующими молочный белок, являются трансглутаминаза, белковая глутаминаза и тирозиназа.

[0039] Настоящее изобретение будет более подробно описано на следующих примерах. Примеры не должны рассматриваться, как ограничивающие формулу изобретения в какой-либо форме.

### ПРИМЕРЫ

#### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРИМЕР 1

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото»(Ajinomoto)) в суспензии глицерин-вода при pH 5,2 при 4°C

[0040] Трансглутаминазу, полученную из штамма *Streptoverticillium mobaraense*, значение активности которой равно 16,300 нкат/г (Activa® TG, «Аджиномото»),

10 растворили с активностью 274 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 5,2 с помощью молочной кислоты. Активность фермента отслеживалась в течение 7 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

15 [0041] На 7-й день активность трансглутаминазы упала наполовину. В течение семидневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРИМЕР 2

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в воде при pH 5,2 при 4°C

20 [0042] Трансглутаминазу Activa® TG («Аджиномото») растворили с активностью 274 нкат/г в воде, значение pH которой было скорректировано до 5,2 с помощью молочной кислоты. Суспензия также включала в себя 0,7% Na-бензоата в качестве консерванта.

25 [0043] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

25 [0044] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 43%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

### ПРИМЕР 1

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии глицерин-вода при pH 4,6 при 4°C

[0045] Трансглутаминазу Activa® TG («Аджиномото») растворили с активностью 274 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

35 [0046] Активность фермента отслеживалась в течение 7 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0047] На 7-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В течение семидневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

### ПРИМЕР 2

40 Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии глицерин-вода при pH 4,6 при 4°C

[0048] Трансглутаминазу Activa® TG («Аджиномото») растворили с активностью 326 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты. Суспензия также включала в себя 0,7% Na-бензоата в качестве консерванта.

45 [0049] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0050] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В

течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

### ПРИМЕР 3

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG-YG («Аджиномото») в суспензии глицерин-  
вода при pH 4,6 при 4°C

[0051] Жидкий состав с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазного препарата Activa® TG-YG от «Аджиномото», который содержит трансглутаминазу, полученную из штамма *Streptoverticillium moharaense*, и глутатион, в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было

корректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0052] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0053] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

### ПРИМЕР 4

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии глицерин-вода при pH 4,4 при 4°C

[0054] Жидкий препарат с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Activa® TG («Аджиномото») в веществе с активностью 274 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было

корректировано до 4,4 с помощью молочной кислоты.

[0055] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0056] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

### ПРИМЕР 5

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии глицерин-вода при pH 4,8 при 4°C

[0057] Жидкий препарат с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Activa® TG («Аджиномото») с активностью 274 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,8 с помощью молочной кислоты.

[0058] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0059] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

### ПРИМЕР 6

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии глицерин-вода при pH 5,1 при 4°C

[0060] Жидкий препарат с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Activa® TG («Аджиномото») с активностью 274 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 5,1 с помощью молочной кислоты, при 4°C.

[0061] Активность фермента. отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0062] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 7

<sup>5</sup> Препарат с трансглутаминазой Saprona TG («Йимин Байолоджикэл Продактс Ко», Китай) в суспензии глицерин-вода при pH 4,6 при 4°C

[0063] Жидкий препарат с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Saprona TG («Имин»), полученной из штамма *Streptoverticillium moharaense*, в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было <sup>10</sup> скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0064] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

<sup>15</sup> [0065] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 8

Препарат с трансглутаминазой Reactyn CL 1000 TG («Кампус СпА», Италия) в суспензии глицерин-вода при pH 4,6 при 4°C

<sup>20</sup> [0066] Жидкий препарат с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Reactyn CL 1000 TG («Кампус») в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0067] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

<sup>25</sup> [0068] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 9

Препарат с трансглутаминазой TG-PG («Аджиномото») в суспензии глицерин-вода <sup>30</sup> при pH 4,6 при 4°C

[0069] Жидкий препарат получили путем растворения в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты, ферментного препарата TG-PG («Аджиномото»). Препаратор TG-PG («Аджиномото») содержит трансглутаминазу, полученную из штамма *Streptoverticillium moharaense*, и белковую глутаминазу, полученную из *Chryseobacterium proteolyticum*.

[0070] Активность трансглутаминазы жидкого препарата равнялась 100 ед./г, а активность белковой глутаминазы жидкого препарата равнялась 100 ед./г.

[0071] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

<sup>40</sup> [0072] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%, и остаточная активность белковой глутаминазы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 10

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии 75% <sup>45</sup> глицерина/25% воды при pH 4,6 при 4°C

[0073] Трансглутаминазу Activa® TG («Аджиномото») растворили с активностью 326 нкат/г в суспензии 75% глицерина/25% воды (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0074] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней при температуре 4°C. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0075] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 100%. В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 11

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии 25% глицерина/75% воды при pH 4,6 при 4°C

[0076] Трансглутаминазу Activa® TG («Аджиномото») растворили с активностью 326 нкат/г в суспензии 25% глицерина/75% воды (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0077] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней при температуре 4°C. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0078] На 50-й день остаточная активность трансглутаминазы составляла 72%. В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 12

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензиях глицерин-вода при pH 4,4-4,8 при 22°C

[0079] Жидкие препараты с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Activa® TG («Аджиномото») в веществе с активностью 2789 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значения pH которой были скорректированы до 4,4-4,8 с помощью молочной кислоты.

[0080] Ферментная активность препаратов отслеживалась в течение 13 недель при температуре 22°C. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препаратов.

[0081] Через две недели хранения активность ферментов в препаратах начала снижаться. В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 13

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензиях глицерин-вода при pH 4,4-4,8 при 4°C

[0082] Жидкие препараты с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Activa® TG («Аджиномото») в веществе с активностью 2789 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значения pH которой были скорректированы до 4,4-4,8 с помощью молочной кислоты.

[0083] Ферментная активность препаратов отслеживалась в течение 26 недель при температуре 4°C. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препаратов.

[0084] Через 26 недель хранения остаточная активность ферментов составляла 89%. В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

#### ПРИМЕР 14

Препарат с трансглутаминазой Activa® TG («Аджиномото») в суспензиях глицерин-вода при pH 4,4 - 4,8 при -20°C

[0085] Жидкие препараты с трансглутаминазой получили путем растворения трансглутаминазы Activa® TG («Аджиномото») в веществе с активностью 2789 нкат/г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значения pH которой были скорректированы до 4,4-4,8 с помощью молочной кислоты.

[0086] Ферментная активность препаратов отслеживалась в течение 26 недель при температуре -20°C. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препаратов.

[0087] Через 26 недель хранения остаточная активность ферментов составляла 97%. В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

**ПРИМЕР 15**

Препарат с тирозиназой в суспензии глицерин-вода при pH 4,6 при 4°C

[0088] Фермент тирозиназы растворили в веществе с активностью 100 ед./г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0089] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0090] Через 50 дней хранения остаточная активность тирозиназы составляла 97%.

В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

**ПРИМЕР 16**

Препарат с белковой глутаминацой в суспензии глицерин-вода при pH 4,6 при 4°C

[0091] Белковую глутаминазу растворили в веществе с активностью 100 ед./г в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0092] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0093] Через 50 дней хранения остаточная активность белковой глутаминацы составляла 96%. В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

**ПРИМЕР 17**

Препарат с трансглутаминацой Activa® TG («Аджиномото») в суспензии сорбит-вода при pH 4,6 при 4°C

[0094] Жидкий препарат с трансглутаминацой получили путем растворения трансглутаминацы Activa® TG («Аджиномото») в веществе с активностью 274 нкат/г в 50% суспензии сорбит-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты.

[0095] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0096] На 50-й день остаточная активность трансглутаминацы составляла 100%. В течение 50-дневной проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

**ПРИМЕР 18**

Жидкий ферментный препарат, включающий в себя TG-PG («Аджиномото») и тирозиназу в суспензии глицерин-вода при pH 4,6 при 4°C

[0097] Жидкий препарат получили путем растворения в 50% суспензии глицерин-вода (массовая доля), значение pH которой было скорректировано до 4,6 с помощью молочной кислоты, ферментного препарата TG-PG («Аджиномото») и тирозиназы. Активность трансглутаминацы жидкого препарата равнялась 100 ед./г, активность белковой глутаминацы жидкого препарата равнялась 100 ед./г, и активность тирозиназы жидкого препарата равнялась 100 ед./г.

[0098] Активность фермента отслеживалась в течение 50 дней. Кроме того, отслеживалась микробиологическая чистота препарата.

[0099] На 50-й день остаточная активность трансглутаминацы составляла 100%, остаточная активность белковой глутаминацы составляла 100%, а остаточная активность тирозиназы составляла 98%. В ходе проверки консервации бактериального роста зафиксировано не было.

[0100] Специалисту в данной области будет очевидно, что, по мере развития технологий, идею изобретения можно реализовать различными способами. Настоящее

изобретение и варианты его осуществления не ограничиваются примерами, описанными выше, но могут варьироваться в пределах объема формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

- 5 1. Жидкий ферментный состав для пищевых продуктов, характеризующийся тем, что он включает в себя по меньшей мере один фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок, выбранный из трансглутаминазы, тирозиназы или белковой глутаминазы в суспензии полиол-вода, содержащей от 25 до 100% (мас.) полиола, и имеющий значение pH в диапазоне от 4,4 до 5,1, регулируемое пищевыми кислотами (кислотой).
- 10 2. Состав в соответствии с п. 1, характеризующийся тем, что суспензия полиол-вода содержит от 50 до 75% полиола.
- 15 3. Состав в соответствии с п. 1, характеризующийся тем, что полиолом является глицерин или сорбитол.
4. Состав в соответствии с п. 1, характеризующийся тем, что значение pH равно 4,6.
- 15 5. Состав в соответствии с п. 1, характеризующийся тем, что состав включает в себя трансглутаминазу и белковую глутаминазу.
6. Состав в соответствии с п. 5, характеризующийся тем, что состав также включает в себя лакказу и/или тирозиназу.
- 20 7. Состав в соответствии с п. 1, характеризующийся тем, что состав не содержит консервантов.
8. Способ приготовления жидкого ферментного состава, отличающийся тем, что по меньшей мере один фермент, сшивающий и/или модифицирующий молочный белок, выбранный из трансглутаминазы, тирозиназы или белковой глутаминазы, добавляют 25 к суспензии полиол-вода, содержащей от 25 до 100% (мас./мас.), и значение pH суспензии доводят пищевой кислотой (кислотами) до значения в диапазоне от 4,4 до 5,1 до или после добавления по меньшей мере одного фермента, сшивающего и/или модифицирующего молочный белок, и, необязательно, добавляют консервант.
- 30 9. Способ в соответствии с п. 8, характеризующийся тем, что суспензия полиол-вода содержит от 50 до 75% полиола.
10. Способ в соответствии с п. 8, характеризующийся тем, что значение pH суспензии полиол-вода равно 4,6.
11. Способ в соответствии с п. 8, характеризующийся тем, что полиолом является глицерин или сорбитол.
- 35 12. Способ в соответствии с п. 8, характеризующийся тем, что ферментами являются трансглутаминаза и белковая глутаминаза.
13. Способ в соответствии с п. 14, характеризующийся тем, что в суспензию также добавляется лакказа и/или тирозиназа.
- 40 14. Способ в соответствии с п. 8, характеризующийся тем, что способ не включает в себя добавление консерванта.