



(12) Ausschließungspatent

(11) **DD 300 815 A5**

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983

in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) A 23 L 1/015
A 23 L 1/231
A 23 J 3/00

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD A 23 L / 342 579 7	(22)	06. 07. 90	(44)	06. 08. 92
(31)	07/377522	(32)	07. 07. 89	(33)	US

(71) siehe (73)

(72) Kwon, Steven Soon-Young, US; Vadehra, Dharam Vir, IN

(73) SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A., 1800 Vevey, CH

(74) Andrae, Flach, Haug, Kneissl, Patentanwälte, Steinstraße 44, W - 8000 München 80, DE

(54) **Proteinhydrolyse**

(55) Entbitterung; Proteinhydrolysat; Polypeptide; Aufschlammung; Kultur; Mikroorganismus; Nahrungsmittelqualität; Hefen; Schimmel; Bakterien; Peptidasen; Polypeptidhydrolyse; Lactobacillus helveticus
(57) Verfahren zur Entbitterung eines enzymatisch hydrolysierten Proteins, das bitterschmeckende Polypeptide enthält, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Aufschlammung des enzymatisch hydrolysierten Proteins mit einer Kultur eines Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität umfaßt, der vorzugsweise ausgewählt ist aus Hefen, Schimmeln und Bakterien und der in der Lage ist, Peptidasen zu erzeugen, die die bitterschmeckenden Polypeptide unter Bildung entbitterter Substanzen hydrolysieren, vorzugsweise mit einer Kultur von Lactobacillus helveticus.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Entbittern eines enzymatisch hydrolysierten Proteins, das bitterschmeckende Polypeptide enthält, wobei das Verfahren das Inkubieren einer Aufschlammung des enzymatisch hydrolysierten Proteins mit einer Kultur eines Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität umfaßt, der in der Lage ist, Peptidasen zu erzeugen, die die bitterschmeckenden Polypeptide unter Bildung entbitterter Substanzen hydrolysieren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität ausgewählt ist aus der Gruppe, die aus Hefen, Schimmeln und Bakterien besteht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Bakterien aus einer Gruppe ausgewählt sind, die aus Streptococci, Lactobacilli und Bacilli besteht.
4. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität Lactobacillus helveticus ist.
5. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität intrazelluläre Peptidasen erzeugt, die in keiner nennenswerten Menge durch die Zellmembran sekretiert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität vor der Inkubation einer Wärmeschockbehandlung unterzogen wurde.
7. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Proteinhydrolyse und das Entbittern des erzeugten Proteinhydrolysats im wesentlichen gleichzeitig oder nacheinander durchgeführt werden.
8. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das enzymatisch hydrolysierte Protein in einer Konzentration von 5 bis 50 Gew.-%, bezogen auf das Gesamtgewicht der Aufschlammung, verwendet wird.
9. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Zellkonzentration des Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität im Bereich von 10^4 bis 10^8 Zellen/g liegt.
10. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Inkubation bei einer Temperatur von 30 bis 55°C für einen Zeitraum von 4 bis 30h durchgeführt wird.
11. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem der pH während der Inkubation von 5 bis 7,5 beträgt.
12. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Inkubation unter Rühren mit einer Geschwindigkeit von 50 bis 300 U/min erfolgt.
13. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem dem erhaltenen Produkt ein Aromamittel zugesetzt wird.
14. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das erhaltene Produkt pasteurisiert wird.
15. Ein entbittertes Protein, das nach einem Verfahren nach irgendeinem der vorausgehenden Ansprüche hergestellt wurde.
16. Verfahren zur Herstellung eines Fleischaromas durch Maillard-Reaktion unter Umsetzung eines entbitterten Proteins nach Anspruch 15 mit einem geeigneten Kohlenhydrat.
17. Maillard-Reaktion-Fleischaroma, das nach einem Verfahren nach Anspruch 16 hergestellt wurde.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur enzymatischen Hydrolyse von Proteinmaterial unter Gewinnung eines Hydrolysats, das im wesentlichen frei von einem bitteren Geschmack ist.

Hydrolysierte Proteine, die in der Lebensmittelindustrie in großem Umfange verwendet werden, können durch Hydrolyse von Proteinmaterial mit Säure, Alkali oder Enzymen hergestellt werden. Einerseits kann jedoch eine saure oder alkalische Hydrolyse die während der Hydrolyse erzeugten essentiellen Aminosäure zerstören, wodurch der Nährwert vermindert wird, während die enzymatische Hydrolyse mit Proteasen nur selten vollständig abläuft, so daß das hydrolysierte Protein erhebliche Mengen an Peptiden enthält, wobei die gebildeten Peptide in Abhängigkeit von der Natur des Proteins und dem für die Proteolyse verwendeten Enzym einen extrem bitteren Geschmack aufweisen können, weshalb sie unter organoleptischen Gesichtspunkten unerwünscht sind.

Es wurden bereits verschiedene Verfahren erprobt, um das Problem der bitterschmeckenden Peptide zu überwinden. Beispielsweise beansprucht die europäische Patentanmeldung Nr. 223560 ein Verfahren zur Geschmackskontrolle eines Proteinhydrolysats, bei dem man ein proteinisches Ausgangsmaterial auswählt, dieses Ausgangsmaterial einer primären enzymatischen Hydrolyse mit einer Proteinase unterzieht, um ein primäres Hydrolysat herzustellen, das Bittersubstanzen enthält, und das dadurch gekennzeichnet ist, daß man das genannte primäre Hydrolysat einer sekundären enzymatischen Hydrolyse mit einem Extrakt unterzieht, der Amino-peptidaseenzyme enthält, wobei die genannte sekundäre enzymatische Hydrolyse bewirkt, daß die genannten Bittersubstanzen wenigstens zu geschmacksneutralen Substanzen umgewandelt werden. Beispiele für beschriebene proteinische Ausgangsprodukte sind Sojaprotein, Gluten, Molkenprotein, Casein, Hämoglobin, Hefeextrakt, Getreideproteine, Milch, Milchpulver, Magermilch, Kartoffel-extrakte und Proteine mikrobiellen Ursprungs. Das einzige für die Herstellung der Amino-peptidasen beschriebene Verfahren verläuft unter Extraktion aus Streptococcus lactis, wobei dieser Extrakt eine kontaminierende Protease enthalten kann, die eine neuerliche Bitterkeit hervorrufen kann, indem sie irgendwelche in dem Substrat zurückgebliebenen Proteine hydrolysiert.

Wir haben nunmehr festgestellt, daß einige proteolytierte Käseprodukte, wie beispielsweise Schweizer Käse oder Cheddar Käse, dann, wenn sie einer Hydrolyse mit Proteaseextrakten und Amino-peptidase unterzogen werden, ihren bitteren Geschmack behalten.

Wir haben nunmehr ein Verfahren zur weitestgehenden Entfernung des bitteren Geschmacks aus enzymatisch hydrolysierten Proteinen gefunden, bei dem man diese mit lebenden Kulturen von bestimmten für Lebensmittelzwecke geeigneten Mikroorganismen inkubiert.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird daher ein Verfahren zum Entbittern eines enzymatisch hydrolysierten Proteins, das bitterschmeckende Polypeptide enthält, geschaffen, das das Inkubieren einer Aufschlammung des enzymatisch hydrolysierten Proteins mit einer Kultur eines Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität umfaßt, der in der Lage ist, Peptidasen zu erzeugen, die die bitterschmeckenden Polypeptide unter Bildung entbitterter Substanzen hydrolysieren.

Das enzymatisch hydrolysierte Protein kann der Proteolyse nach herkömmlichen Verfahren von proteinhaltigen Materialien entstammen, wie beispielsweise von Pflanzenprotein, Hühnchen, Fleisch, Fisch, Casein, Hart- oder Weichkäse, z. B. Schweizer Käse oder Cheddar Käse, Molkenprotein oder Peptamen. Während der Proteolyse werden bitterschmeckende Polypeptide erzeugt. Es ist dabei darauf hinzuweisen, daß gemäß der vorliegenden Erfindung die Proteinhydrolyse und die Entbitterung des erzeugten Proteinhydrolysats in aufeinanderfolgenden Schritten erfolgen können, daß sie aber auch gewünschtenfalls im wesentlichen gleichzeitig durchgeführt werden können, indem man die Proteinaufschlammung mit einem proteolytischen Enzym und mit einer Kultur des Mikroorganismus von Lebensmittelqualität mischt und alles zusammen inkubiert.

Der Mikroorganismus von Lebensmittelqualität kann beispielsweise ausgewählt werden aus Hefen, Schimmeln, Bakterien, wie beispielsweise Streptococci, Bacilli oder Lactobacilli, wobei Lactobacillus helveticus bevorzugt ist. Der Mikroorganismus von Lebensmittelqualität kann intrazelluläre Peptidasen erzeugen, die durch die Zellmembran sekretiert werden können oder die nicht in irgendwelchen nennenswerten Mengen sekretiert werden. Wenn die Peptidasen in den Zellen verbleiben, wird angenommen, daß die bitterschmeckenden Polypeptide durch Permeation in die Zellen eindringen, wo sie durch die Peptidasen unter Bildung entbitterter Substanzen hydrolysiert werden, welche letzteren durch Permeation die Zellen wieder verlassen und in die Aufschlammung gelangen.

Die von dem Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität erzeugten Peptidasen sind üblicherweise Dipeptidase, Tripeptidase, Aminopeptidase und Carboxypeptidase.

Vorteilhafterweise kann der Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität vor dem Inkubieren einer Wärmeshockbehandlung unterzogen werden, beispielsweise durch Behandlung bei 55 bis 70°C für bis zu einigen wenigen Minuten, um die Zellwände porös zu machen und ihre Fähigkeit zu vermindern, aus freiem Zucker Säuren zu erzeugen.

Das enzymatisch hydrolysierte Protein wird geeigneterweise in einer Konzentration von 5 bis 50 Gew.-%, vorzugsweise von 10 bis 30 Gew.-%, an Feststoffen, bezogen auf das Gesamtgewicht der Aufschlammung, verwendet.

Die Zellkonzentration des Mikroorganismus von Nahrungsmittelqualität liegt geeigneterweise im Bereich von 10^3 bis 10^{10} Zellen/g und vorzugsweise im Bereich von 10^4 bis 10^8 Zellen/g.

Die Inkubationstemperatur liegt geeigneterweise im Bereich von 30 bis 60°C und vorzugsweise im Bereich von 35 bis 50°C. Es ist eine Inkubationsdauer von 4 bis 30h geeignet, wobei eine Inkubationsdauer von 10 bis 24 h und insbesondere von 12 bis 20 h bevorzugt ist.

Der pH während der Inkubation kann im Bereich von 5 bis 7,5 und vorzugsweise im Bereich von 5,5 bis 7,2 liegen, wobei der optimale pH von der Natur des Substrats abhängt.

Die Inkubation kann auch ohne Rühren durchgeführt werden, jedoch wird die Aufschlammung vorzugsweise bewegt, beispielsweise durch Rühren bei 50 bis 300 U/min.

Das nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene entbitterte Protein kann als ein Material für die Herstellung von Fleischaromen durch Maillard-Reaktion verwendet werden, indem man es nach dem Fachmann gut bekannten Verfahren mit geeigneten Kohlenhydraten umsetzt.

Nach der Inkubation wird das entbitterte Protein beispielsweise bei einer Temperatur von 65 bis 80°C innerhalb eines Zeitraums von 10 bis 30 min pasteurisiert, vorzugsweise unter Rühren, oder durch eine Hochtemperatur-Kurzzeitbehandlung, woran sich ein Kühlen anschließt. Gewünschtenfalls können Geschmacksmittel, z. B. Propionsäure, vor oder nach der Pasteurisierung zu der Aufschlammung zugesetzt werden.

Das Endprodukt kann getrocknet werden und kann als solches bei Raumtemperatur gelagert werden. Wenn das Endprodukt sich in flüssigem Zustand befindet, sollte es unter Gefrier- oder Kühlbedingungen gelagert werden, und zwar in Abhängigkeit von der beabsichtigten Lagerungsdauer.

Die vorliegende Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen weiter erläutert. Teile und Prozentangaben sind jeweils auf das Gewicht bezogen, es sei denn, es ist etwas anderes angegeben.

Beispiel 1

Würfel aus Schweizer Käse wurden nach einer Zugabe von Wasser, 1,2% Salz und 0,9% Natriumcitratpuffer zur Einstellung eines pH von 5,8 in einem Nahrungsmittel-Processor in eine 70%ige Aufschlammung (die etwa 19% Protein enthält) überführt. Anschließend wurden die Proteinhydrolyse und die gleichzeitige Entbitterung des erzeugten Proteinhydrolysats dadurch durchgeführt, daß man die Aufschlammung mit einer Proteaselösung und einer Lactobacillus helveticus-Kultur mit einer Zellkonzentration von 10^7 Zellen/g mischte, wobei die letztere durch Wärmebehandlung bei 60°C für 1 min einer Wärmeshockbehandlung unterzogen worden war. Die Inkubation wurde bei 45°C 16h ohne Rühren durchgeführt. Nach der Inkubation wurde die entbitterte Schweizer Käse-Aromaaufschlammung mit 1,5% Propionsäure vermischt, um das Aroma zu verbessern, und dann bei 75°C 15 min unter Rühren pasteurisiert, wonach das Produkt endverpackt wurde. Das Produkt hatte ein angenehmes Aroma, das völlig frei von Bitterkeit war.

Beispiel 2

Eine 20%ige Hühnerbrühen-Hydrolysataufschlammung wurde mit einer Lactobacillus helveticus-Kultur bei einer Zellkonzentration von 10^7 Zellen/g bei 45°C 16h bei pH 6,2 unter Rühren mit 200 U/min inkubiert. Das Produkt wurde bei 77°C 15 min unter Rühren pasteurisiert und dann auf weniger als 5°C abgekühlt. Das Produkt hatte ein angenehmes Aroma frei von Bitterkeit.

Beispiel 3

Eine 20%ige Caseinhydrolysat-Aufschlämmung wurde mit einer *Lactobacillus helveticus*-Kultur bei einer Zellkonzentration von 10^7 Zellen/g bei 45°C für 16h bei pH 7,0 unter Rühren mit 150U/min inkubiert.

Das Produkt wurde bei 70°C 15min unter Rühren pasteurisiert und auf weniger als 5°C abgekühlt. Das Produkt hatte ein angenehmes Aroma und war frei von Bitterkeit.

Beispiel 4

Eine 20%ige Molkenproteinhydrolysat-Aufschlämmung, die durch alkalische Hydrolyse von Molkenprotein erhalten worden war, wurde mit einer *Lactobacillus helveticus*-Kultur bei einer Zellkonzentration von 10^7 Zellen/g bei 45°C für 16h bei pH 7,0 unter Rühren mit 100U/min inkubiert.

Das Produkt wurde bei 70°C für 15min pasteurisiert und dann auf weniger als 5°C abgekühlt. Es wies ein angenehmes Aroma frei von Bitterkeit auf.

Beispiel 5

Sojabohnenproteinhydrolysat wurde zu einer 10%igen Lösung in Wasser verarbeitet und mit einer *Lactobacillus helveticus*-Kultur für 8h bei 55°C bei einem pH im Bereich von 6,5 bis 7,0 inkubiert. Am Ende der Inkubation war das Produkt nicht nur entbittert, sondern wies auch keine bohrentypische Geschmacksnoten mehr auf. Das Produkt wurde bei 70°C 15min pasteurisiert und in der Herstellung anderer Aromamittel durch Reaktions-Aromatechnologie verwendet.