

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 120790

Int. Cl. C 07 g 7/00 Kl. 12p-16

Patentsøknad nr. 164.702 Inngitt 13.IX 1966

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 7.XII 1970

Prioritet begjært fra: 17.IX-65 Sveits,
nr. 12914/65

Société des Produits Nestlé S.A.,
1800 Vevey, Sveits.

Oppfinner: Jürgen Solms, Im Glockenacker 15,
8053 Zürich, Sveits.

Fullmektig: Mag. scient. Knud-Henry Lund.

Fremgangsmåte ved fremstilling av
proteinhydrolysater.

Proteinhydrolysater er blandinger av aminosyrer og peptider som er i stand til å forsyne organismen i en direkte assimilerbar form med proteinbygggestener. Av denne grunn utgjør proteinhydrolysater produkter med høy næringsverdi. Man kjenner en rekke metoder for hydrolysering av proteiner. Disse fremgangsmåter kan deles i tre klasser som skiller seg ved det anvendte hydrolyseringsmiddel, d.v.s. i sur hydrolyse, alkalisk hydrolyse og enzymatisk hydrolyse.

De fremgangsmåter som er forbundet med hver av de tre kategorier er forbundet med spesielle fordeler og spesielle ulemper. Den sure hydrolyse ødelegger f.eks. en ikke uvesentlig del av aminosyrene og det ferdige produkt inneholder en betraktelig mengde

hydrolyseringsmiddel som må nøytraliseres eller fjernes. Videre gir disse hydrolyseringsbetingelser opphav til dannelse av uønskede produkter ved siden av. Den alkaliske hydrolyse har en kjedelig tendens til å isomerisere visse aminosyrer. Videre vil hydrolysatet vanligvis inneholde en viss mengde alkali som ikke lett fjernes. Den enzymatiske hydrolyse, som generelt fører til et brukbart produkt, gir ofte på grunnlag av frie aminer i ferdigproduktet, relativt små utbytter. Disse hydrolysater har også ofte en ubehagelig lukt og smak som begrenser deres anvendelsesområde.

Foreliggende fremgangsmåte gjør det mulig å unngå en del av disse ulemper. Fremgangsmåten karakteriseres spesielt av at man behandler proteinene med minst et proteolytisk enzym og minst en fosfatase.

Man behandler først proteinene med det proteolytiske enzym og etter en i hvert fall partiell nedbrytning tilsettes fosfatasen.

Behandlingen med fosfatase følges av i det minste en ytterligere behandling med et proteolytisk enzym for å øke hydrolysegraden.

De proteinmaterialer som benyttes som utgangsmateriale for foreliggende fremgangsmåte kan være av animalsk, vegetabilsk eller mikrobiologisk opprinnelse. Kasein, laktalbumin, fiskemel, presskaker fra vegetabilsk oljefremstilling, gjær samt cellematerialer fra forskjellige mikroorganismer.

Det er en fordel at de proteiner som utsettes for ovenstående behandling er så lite denaturert som mulig. Dette krav oppfylles ved å unngå å utsette proteinene for en varmebehandling før hydrolysen. Forbindelser som f.eks. laktalbumin kan ikke utsettes for temperaturer på over 70°C under isolering og tørking hvis man vil unngå degradering. Man har funnet at ved å gå frem på denne måte, d.v.s. ved å unngå å utsette utgangsmaterialet for termisk påvirkning, kommer man frem til et produkt med bedre smak.

De proteaser som kan anvendes for hydrolysen av proteinene kan være av animalsk, vegetabilsk eller mikrobiologisk opprinnelse. Man kan eksempelvis benytte pankreatin, pepsin, erepsin, trypsin, chymotrypsin, ficin, bromelin, papain, gjær, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* og soppenzymer i den serie som er kjent under varemerket "RHOZYME".

Hydrolysen av fosforgruppene kan skje ved hjelp av en

hvilken som helst fosfatase av vegetabilsk, animalsk eller mikrobiologisk opprinnelse. Man kan med hell benytte både sure og basiske fosfataser, man kan f.eks. benytte slangefosfatase, og fosfataser fra lever, poteter, appelsinskall, korn, gjær, osv. I henhold til oppfinnelsen kan det være en fordel å anvende enzymer som, bortsett fra fosfataseaktiviteten oppviser en sekundær enzymatisk aktivitet som f.eks. proteolytisk virksomhet. Man kan forøvrig også benytte en kombinasjon av proteaser og fosfataser.

Når de proteinholdige utgangsstoffer omfatter fettstoffer, tilsettes fortrinnsvis under isoleringen av proteinet, under hydrolysen eller i løpet av disse to operasjoner, en liten mengde antioksyderende forbindelser, hvis mengde f.eks. beregnes ut fra vektmengden av fettstoffet, og som kan ligge på mellom 0,01 og 0,06 %. Man kan benytte et stort antall antioksydanter, naturlige forbindelser som f.eks. basert på tocoferol ("Tocomix D") eller antioksydanter basert på butylhydroksyanisol er spesielt virksomme.

Hydrolysebetingelsene avhenger av de valgte enzymer. De viktigste faktorer som må bestemmes er pH i reaksjonsblandingen og temperaturen. Hydrolysen utføres ved en temperatur på over 40°C og holdes fortrinnsvis mellom 50 og 70°C for i så høy grad som mulig å unngå uønsket infeksjon. Følgelig er det en fordel å bruke enzymer (proteaser eller fosfataser) som har optimal aktivitet innenfor ovennevnte temperaturintervall.

Reaksjonsmiljøets pH bestemmes likeledes ut fra de betingelser hvor enzymet oppviser optimal aktivitet. Hvis det f.eks. dreier seg om en sur fosfatase, må pH holdes på det sure området. Surhetsgraden reguleres helst omhyggelig under hydrolysen og justeres ved tilsetning av syre eller alkali, f.eks. melkesyre, saltsyre eller kalsiumhydroksyd. Glutaminsyre kan også brukes med hell for å surgjøre reaksjonsblandingen.

Hydrolysen utføres i et vandig miljø som inneholder 5 - 25 % tørrstoff. Det er gunstig å for-varme suspensjonen i ca. en halv time før enzymene tilsettes. Temperaturen og pH reguleres deretter til de verdier som tilsvarer optimal aktivitet for de anvendte enzymer. Hydrolysen kjøres i et tidsrom på mellom 5 og 20 timer, hvorunder surhetsgraden holdes på en bestemt verdi ved tilsetning av syre eller base. Etter dette tidsrom kan fosfatasen tilsettes og reaksjonsmiljøet justeres. I henhold til en spesiell utførelse av fremgangsmåten fullendes hydrolysen ved en tilsetning

av protease, hvor sistnevnte kan være av samme type eller forskjellig fra den som ble anvendt under første hydrolyse. Man kan likeledes bruke en blanding av to enzymer.

Hydrolysereaksjonen foretas fortrinnsvis under forhold som gir et utbytte av oppløselige stoffer på 70 - 90 % og en degraderingsgrad på over 50 % (d.v.s. at over 50 % av det totale nitrogen i sluttproduktet foreligger i form av amin-nitrogen).

Når hydrolysen er ferdig, oppvarmes reaksjonsblandingen til en temperatur på omtrent 95 - 100°C for å inaktivere enzymene og inhibere eventuelle sekundære reaksjoner. Den uoppløselige fraksjon fraskilles deretter og hydrolysatoropløsningen som vanligvis inneholder 6 - 20 % tørrstoff konsentreres til en pasta eller tørkes på egnet måte (sprøytetørking, valsetørking, vakuumbtørking, frysetørking osv.) til et pulverformet produkt.

Det er under tørkingen en fordel ikke å utsette produktet for høye temperaturer, d.v.s. ikke over 80°C i de fleste tilfeller.

En av virkningene av fosfatasen som tilsettes under hydrolysen består i en avgjørende minskning av fosfopeptiddannelse, som ellers gir en meget bitter smak. I henhold til oppfinnelsen har man funnet at det ferdige produkt kan forbedres ytterligere i smak ved en behandling som nedsetter innholdet av L-fenylalanin og L-tryptofan. Man har kunnet konstatere at L-isomerene for disse to aminosyrer er meget bitre, hvilket i enda høyere grad gjelder deres kalsiumsalter. Natriumsaltene er mindre bitre enn de frie aminosyrer og D-isomerene av fenylalanin og tryptofan har overraskende nok praktisk talt ikke bitter smak.

For å minske innholdet av L-fenylalanin og L-tryptofan i produktet, behandles hydrolysatoropløsningen fortrinnsvis med aktiv-kull. I henhold til en utførelse tilsettes oppløsningen mellom 5 og 20 vekt-% aktiv-kull, idet mengden er beregnet på innholdet av tørrstoff, hvorefter blandingen oppvarmes til omkring 60 - 80°C. På denne måte kan produktets innhold av L-tryptofan nedsettes til omkring 1,2 % av tørrstoffet, slik at det ferdige produkt unngår den ubehagelige bitre smak.

Det hydrolysat som fremstilles ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen utgjør en kilde til oppløselige proteiner som kan assimilere direkte, i en form med god smak og lettvinnt anvendelse, brukbar som ernæringsmiddel. Hydrolysatet kan anvendes

for seg eller tilsettes forskjellige matvarer og drikker som supper, buljonger, melk, fruktsafter, sauser, kryddere eller diet-sammensetninger osv. Produktet kan frembys på forskjellige måter, f.eks. som pulvere, granulater, blokker, pastaer eller væsker. I fysiologisk oppløsning og etter sterilisering kan hydrolysatet likeledes administreres ved injeksjon.

I de følgende eksempler vil vi illustrere fremgangs-måten i henhold til oppfinnelsen.

Eksempel 1

100 kg rensed lactalbumin tørket ved lav temperatur med følgende sammensetning,

tørrstoff	95,5 %
total nitrogen	12,5 %
fettstoff	4,5 %
laktose	3,0 %
aske	3,0 %
hvorav Na	0,1 %

oppmales og siktes (U.S. Standard, 70 masker). Pulveret suspenderes deretter i 700 l vann og man oppvarmer blandingen til 50°C i 30 minutter. Til suspensjonen settes deretter en blanding av 5 kg pankreatin og 45 l vann, og deretter enda 2 l av en emulsjon "Tocomix"-vann, inneholdende 0,41 g flytende "Tocomix D". Reak-sjonsblandingen røres og hydrolysens varighet er 5 timer, ved 50°C og utgangs pH på 7,2. pH reguleres ved tilsetning av en $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -suspensjon. Etter 3 timer stanses tilsetningen av kalsiumhydroksyd. Hvis pH etter 5 timer ikke har oppnådd verdien 6,9, tilsettes en liten mengde glutaminsyre (50 - 450 g). Man tilsetter deretter 50 l av et ekstrakt av kornspire rikt på fosfater.

Dette ekstrakt fremstilles ved å dispergere 9 kg av det pulveriserte korn i 50 l vann under røring i flere timer, fulgt av fraskillelse av den uoppløselige bestanddel. Etter regulering av fosfataseaktiviteten tilsettes ekstraktet til reaksjonsblandingen. Hydrolysen skjer uten regulering av pH. Man venter 2 timer og tilsetter en blanding av 3 kg pankreatin i suspensjon med 20 l vann og bibeholder hydrolysebetingelsene inntil reaksjonen er fullbragt, hvilket er etter omkring 9 timer. Råhydrolysatet oppvarmes deretter til en temperatur på 97°C, hvorefter den oppløselige fraksjon fraskilles ved sentrifugering. Det rene hydrolysat med et tørrstoffinnhold på omkring 10 % blandes ved en temperatur på

70 - 80°C med en mengde aktiv-kull som tilsvarer omkring 15 vekt-% av tørrstoffet og filtreres 15 minutter senere gjennom en filterpresse. Filtratet konsentreres til et tørrstoffinnhold på 30 %, hvorefter det tørkes ved forstøvning i en beholder med en temperatur som ikke overstiger 80°C. Man får således 76 kg tørrstoff i form av et pulver eller som granulater, inneholdende:

tørrstoff	96,5 %
total nitrogen	12,1 %
amin-nitrogen	6,3 %
aske	3,0 %
hvorav Na	0,1 %

Innholdet av fenylalanin er 3,0 % (i fri form) og tryptofan 1,6 %, hvorav omtrent halvparten foreligger i bundet form og således ikke er bitter. Produktet er oppløselig i varmt vann og gir en klar oppløsning med en behagelig smak.

Eksempel 2

100 kg rensset, tørket og finmalt kasein med følgende sammensetning:

tørrstoff	95,6 %
total nitrogen	13,4 %
fettstoffer	0,6 %
aske	9,2 %
laktose	0 %

behandles som i eksempel 1. Man får 74 kg av et tørt pulver med følgende sammensetning:

tørrstoff	95,2 %
total nitrogen	12,2 %
amin-nitrogen	6,5 %
aske	3,2 %

Dette pulver er oppløselig i varmt vann og gir en ren og klar oppløsning med behagelig smak, men er bitrere enn preparatet ifølge eksempel 1.

Eksempel 3

100 kg laktalbumin med samme sammensetning som angitt i eksempel 1 behandles som beskrevet i eksempel 1, bortsett fra at pH ikke reguleres ved hjelp av Ca(OH)_2 , men ved hjelp av en blanding inneholdende en del Ca(OH)_2 og 2 deler NaOH, idet de to stoffer er blandet i vann til en konsentrasjon på 15 %. Man får et produkt med

en sammensetning som ligger meget nær opp til den som er angitt i eksempel 1.

Dette pulver er imidlertid kalsium-fattig og inneholder mer natrium (0,9 %). Det er oppløselig i varmt vann og gir en ren, klar oppløsning hvor smaken er bedre enn det beskrevne produkt i eksempel 1 på grunn av det reduserte kalsiuminnhold.

Eksempel 4

100 kg laktalbumin med samme sammensetning som angitt i eksempel 1 behandles som beskrevet i dette eksempel bortsett fra at man tilsetter 40 kg av et ekstrakt fra poteter som er rikt på fosfatase i stedet for et kornekstrakt. Man får 76 kg pulverformet produkt med en sammensetning praktisk talt identisk med den som er angitt i eksempel 1. Pulveret er oppløselig i varmt vann og gir en ren, klar oppløsning med en behagelig smak av samme karakter som ifølge eksempel 1.

Eksempel 5

100 kg laktalbumin med samme sammensetning som angitt i eksempel 1 behandles som beskrevet i dette eksempel bortsett fra at man tilsetter 30 kg bakegjær i stedet for kornekstrakt. Man får et pulver med følgende sammensetning:

tørrstoff	92,2 %
total nitrogen	11,0 %
amin-nitrogen	6,0 %

Dette pulver er godt oppløselig i varmt vann og gir en ren, klar oppløsning med behagelig smak av samme karakter som i eksempel 1.

Eksempel 6

333 kg friskt isolert laktalbumin, men utørket, med følgende sammensetning:

tørrstoff	33,0 %
total nitrogen	4,16 %
fettstoffer	1,5 %
laktose	1,0 %
aske	1,0 %
hvorav Na	0,03 %

suspenderes i 470 l vann. Suspensjonen oppvarmet til 97°C og kjøles deretter i løpet av 30 minutter til 50°C. Blandingen

hydrolyseres deretter som beskrevet i eksempel 1. Man får et pulverformet produkt med sammensetning, egenskaper og smak identisk med produktet ifølge eksempel 1.

Eksempel 7

100 kg kasein oppmales og siktes (U.S. Standard sikt, 70 masker) og suspenderes deretter i 500 l vann. Suspensjonen varmes til 60°C i 30 minutter hvorefter man tilsetter en blanding av 8 kg pepsin og 25 l vann. Det tilsettes ytterligere en emulsjon av "Tocomix"-vann inneholdende 0,41 g flytende "Tocomix D". Reaksjonsblandingens omrøres og hydrolysen varer i 3 timer. Temperaturen holdes ved 60°C og pH-verdien holdes på 3,0 og reguleres ved tilsetning av melkesyre. Ved slutten av reaksjonen senkes temperaturen til 40°C og man tilsetter 500 kg av en frisk suspensjon av Torula-gjær inneholdende 12 % tørrstoff. Det tilsettes ytterligere til blandingen 3 kg av en protease fra *Aspergillus oryzae*.

Det hele omsettes i 4 timer ved en temperatur på 40°C og pH = 4,0 og deretter i 13 timer ved 60°C og pH 6,5. pH reguleres ved tilsetning av melkesyre eller en suspensjon av Ca(OH)_2 . Etter 20 timers reaksjon oppvarmes hydrolysatet til 97°C og man fraskiller den uoppløselige reaksjon ved sentrifugering. Det rene hydrolysat tilsettes en mengde aktiv-kull som tilsvarer 15 % av tørrstoffet og filtreres 15 minutter senere gjennom en filterpresse. Filtratet oppkonsentreres til et tørrstoffinnhold på 30 %, hvorefter det tørkes ved forstøvning i et rom som har en temperatur ikke over 80°C. Man får 65 kg tørrprodukt i form av et pulver eller granulat som inneholder:

tørrstoff	97,2 %
total nitrogen	10,8 %
amin-nitrogen	5,6 %

Produktet er oppløselig i varmt vann og gir en ren, klar oppløsning med behagelig smak.

Eksempel 8

100 kg soya-proteiner kjent under varemerket "PROMAX" med følgende sammensetning:

tørrstoff	97,0 %
total nitrogen	11,2 %
aske	4,7 %

siktes (U.S. Standard sikt, 70 masker) og suspenderes i 700 l vann.

Blandingen behandles deretter som beskrevet i eksempel 1. Man får 72 kg av et tørt pulver med følgende sammensetning:

tørrstoff	95,0 %
total nitrogen	11,7 %
amin-nitrogen	7,0 %
aske	4,0 %

Dette pulver er oppløselig i varmt vann og gir en klar oppløsning som imidlertid ikke er fullt så god som produktet ifølge eksempel 1.

Eksempel 9

100 kg fiskemel markedsført under varemerket "TORD" med følgende sammensetning:

tørrstoff	96,0 %
total nitrogen	13,3 %
fettstoff	0,3 %
aske	9,0 %

siktes (U.S. Standard sikt, 70 masker) og suspenderes i 700 l vann. Blandingen behandles deretter som beskrevet i eksempel 1. Man får 76 kg av et tørt pulver med følgende sammensetning:

tørrstoff	95,0 %
total nitrogen	12,9 %
amin-nitrogen	4,5 %
aske	4,5 %

Pulveret er oppløselig i varmt vann og gir en klar oppløsning med behagelig smak, hvor man imidlertid kan spore en anelse av fisk.

Eksempel 10

100 kg laktalbumin med samme sammensetning som angitt i eksempel 1 behandles som beskrevet i dette eksempel bortsett fra at pancreatin erstattes av et enzym markedsført under betegnelsen "RHOZYME P 11". De andre betingelser overholdes på samme måte. Man får 62 kg ferdig produkt i form av et tørt pulver med følgende sammensetning:

tørrstoff	92,0 %
total nitrogen	12,0 %
amin-nitrogen	5,1 %
aske	3,0 %

Pulveret er oppløselig i varmt vann og gir en klar oppløsning med behagelig smak.

Eksempel 11

100 kg laktalbumin med samme sammensetning som angitt i eksempel 1 suspenderes i 700 l vann. Suspensjonen oppvarmes til 50°C over 30 minutter og man tilsetter en blanding av 5 kg pankreatin og 45 l vann. 2 l av en emulsjon av "Tocomix" inneholdende 0,41 g flytende "Tocomix D" tilsettes deretter til suspensjonen. Reaksjonsblandingen holdes under røring og hydrolysetiden blir 5 timer ved 50°C og utgangs-pH på 7,2. pH reguleres ved tilsetning i løpet av de tre første timer av en suspensjon av $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Ved slutten av reaksjonen tilsettes en liten mengde glutaminsyre (50 - 450 g) hvis pH ikke har oppnådd en verdi på 6,9 og deretter 50 l kornekstrakt fra fosfataserikt korn fremstilt som beskrevet i eksempel 1. Hydrolysen foretas uten korrigerende av pH. Man lar det hele reagere i 2 timer og tilsetter deretter 1 kg av et enzym kjent under varemerket "RHOZYME W 15" suspender i 20 l vann, eller 0,5 kg ficin suspendert i 10 l vann. Hydrolysen fortsettes inntil man får en total reaksjonstid på 9 timer. Råhydrolysatet oppvarmes deretter til 97°C og fremgangsmåten går deretter som beskrevet i eksempel 1. Man får 74 kg "RHOZYME W 15" eller 76 kg (ficin) av et tørt pulver med følgende sammensetning:

	Type I (RHOZYME W 15)	Type II (ficin)
tørrstoff	95,0 %	95,0 %
total nitrogen	11,9 %	12,3 %
amin-nitrogen	4,5 %	5,8 %
aske	3,0 %	3,0 %

Dette pulver er godt oppløselig i varmt vann og gir en klar oppløsning med behagelig smak.

Eksempel 12

100 kg laktalbumin med samme sammensetning som angitt i eksempel 1 behandles som beskrevet i dette eksempel bortsett fra at man etter hydrolyse, filtrering og konsentrering arbeider som følger:

Hydrolysatet, som har et tørrstoffinnhold på mellom 10 og 35 %, fordeles på plater som lag med 0,3 til 4 cm tykkelse. Produktet bringes til å stivne ved en temperatur på under -12°C og tørkes i denne form ved frysetørring. I løpet av denne operasjon må

trykket holdes på en slik verdi at man unngår smelting, f.eks. 0,7 eller til og med 0,15 Torr. Man får et tørt produkt med svak hygroskopisitet. Etter oppdeling og sikting konserveres produktet i metallbokser. Pulveret er godt oppløselig i varmt vann og gir en klar oppløsning med en meget behagelig smak.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte til fremstilling av proteinhydrolysater med forbedret ikke-bitter smak, og hvor de uoppløselige materialer når hydrolysen er ferdig, fraskilles og hydrolyseoppløsningen konsentreres, hvorefter det konsentrerte hydrolysat tørkes til et produkt i form av pulver eller granulat, k a r a k t e r i s e r t v e d at proteinene først behandles på kjent måte med et proteolytisk enzym, og etter en i det minste partiell nedbrytning behandles uten inaktivering av enzymet med en fosfatase, idet proteinene etter behandling med fosfatase viderebehandles en eller flere ganger med minst et proteolytisk enzym, idet hydrolysen utføres i vandig miljø ved en temperatur over 40°C og hydrolyseblandingen inneholder 5 - 25 % protein-tørrstoff og at reaksjonsblandingen, når den ønskede hydrolysegrad er oppnådd, oppvarmes til en temperatur på mellom 95 og 100°C for å inaktivere enzymene.
2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at hydrolysatoppløsningen behandles med aktiv-kull med mellom 60 og 80°C for å nedsette innholdet av L-fenylalanin og L-tryptofan, idet aktiv-kullmengden utgjør mellom 5 og 20 % av hydrolysatets tørrstoffinnhold.
3. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at nevnte reaksjonsblanding oppvarmes i ca. 30 minutter før hydrolysen.
4. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at hydrolysen utføres inntil mellom 70 og 90 % av proteinene er oppløseliggjort.
5. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at hydrolysen fortsettes inntil man får en nedbrytningsgrad for proteinene på minst 50 %.
6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som protein-råstoff benyttes laktalbumin som er blitt isolert ved temperaturer som ikke overskrider 70°C.

Anførte publikasjoner:

J. Sci. Food Agriculture 7, 629-37 (1956)