



# SUOMI - FINLAND (FI)

## PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN



F I 000110660B

### (12) PATENTTIJULKAISU PATENTSKRIFT

(10) FI 110660 B

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats

14.03.2003

(51) Kv.lk.7 - Int.kl.7

**A23J 3/34, 3/10, 1/20**

(21) Patenttihakemus - Patentansökning

**942122**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag

06.05.1994

(24) Alkupäivä - Löpdag

09.11.1992

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig

06.05.1994

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan

PCT/DK92/00326

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

08.11.1991 EP 91610088 P

27.11.1991 EP 91610091 P

27.05.1992 DK 711/92 P

(73) Haltija - Innehavare

**1 •Novozymes A/S**, Krogshoejvej 36, 2880 Bagsvaerd, TANSKA, (DK)

(72) Keksijä - Uppfinnare

**1 •Nielsen, Per Munk**, Rytterstien 29 A, 3400 Hilleroed, TANSKA, (DK)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab  
Jaakonkatu 3 A, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Kaseiinihydrolysaatti ja menetelmä tämän kaseiinihydrolysaatin valmistamiseksi**  
**Kaseinhydrolysat och förfarande för framställning av detta kaseinhydrolysat**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 274946 (A23J 3/00), US A 4600588 (A23C 9/12)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Uusi kaseiinihydrolysaatti ei sisällä hydrolysoitumatonta kaseiinia ja sille on ominaista tietty nimenomainen suhteellisten moolimassojen jakautuma. Menetelmän luonteenomaisena piirteenä on se, että siinä käytetään apuna kolmea tarkkaan määrättyä proteolyyttistä entsyymiä ja menetelmä on ei-pH-staatti-menetelmä. Kaseiinihydrolysaattissa on optimaalinen tasapaino DH:n, vapaiden aminohappojen, kitkeryyden ja saannon välillä.

Det nya kaseinhydrolysatet innehåller icke ohydrolyserat kasein och det är kännetecknat av en bestämd fördelning av relativa molmassor. Metoden är kännetecknad av att den utförs med användning av tre bestämda proteolytiska enzymer och att den är en icke-pH-stat-metod. Kaseinhydrolysatet har en optimal balans mellan DH, fria aminosyror, bitterhet och utbyte.

**Kaseiinihydrolysaatti ja menetelmä tämän kaseiinihydrolysaatin valmistamiseksi**

5       Keksintö käsittää kaseiinihydrolysaatin ja menetelmän tämän kaseiinihydrolysaatin valmistamiseksi.

10       Kaseiinihydrolysaatteja käytetään pääasiassa ainesosina vauvanruuassa ja useat erilaiset kaseiinihydrolysaatit ja menetelmät kaseiinihydrolysaattien valmistamiseksi ovat tunnettuja. Ainakin neljällä kaseiinihydrolysaatteja ja niiden valmistusmenetelmiä koskevalla osatekijällä on tärkeä merkitys mahdollisimman hyvän lopputuloksen saavuttamiselle, ja nämä ovat 1) menetelmällä saavutettava suuri DH-arvo (hydrolysoitumisaste), jonka vaikutuksesta tuotteen peptidit ovat lyhyehköjä ja sen allergeenisuus on vähäinen, 2) tuotteen pieni vapaiden aminohappojen pitoisuus, minkä vaikutuksesta osmolaalisuus on vähäinen, mikä on edullista käytettäessä tuotetta ruokavaliossa, 3) pieni kitkeryys ja 4) suuri saanto.

20       Useita kaseiinihydrolysaatin valmistusmenetelmiä, joilla saadaan aikaan hyvät organoleptiset ominaisuudet, on mahdollista käyttää vain niin, että saanto jää pieneksi. Tämä merkitsee yleisemmin tarkasteltuna sitä, että optimaaliseen tasapainoon pääseminen edellä mainittujen neljän osatekijän välillä on vaikeaa. Tämän keksinnön tarkoituksena onkin saattaa käyttöön ominaisuuksiltaan optimaalinen kaseiinihydrolysaatti sekä tämän kaseiinihydrolysaatin valmistusmenetelmä, toisin sanoen kaseiinihydrolysaatti, jonka DH-arvo on suuri, vapaiden aminohappojen pitoisuus pieni, kitkeryys vähäistä ja saanto suuri.

30       Tämän keksinnön mukaisesti on tehty se hämmästyttävä löytö, että tietyllä erityisten entsyymien ja sellaisen hydrolyysin, jossa pH:ta ei säädetä vakioarvoon (non-pH-stat), yhdistelmällä saadaan käyttöön

kaseiinihydrolysaatin valmistusmenetelmä, jossa vallitsee optimaalinen tasapaino DH:n, vapaiden aminohappojen, kitkeryyden ja saannon välillä.

5 Tämän keksinnön mukaisessa kaseiinihydrolysaatissa ei ole lainkaan hydrolysoitumatonta kaseiinia ja sille on ominaista, että kaseiinihydrolysaatti on täydellisesti liukoinen tai lähes täydellisesti liukoinen vesipitoiseen mediumiin, että sen pH-arvo on alueella 3,5 - 7,0, että sen organoleptinen laatu on hyvä, että se sisältää peptidejä, joiden  
10 suhteelliset määrät vastaavat seuraavan luettelon mukaista suhteellisten moolimassojen jakautumaa (MW on suhteellisen moolimassan lyhenne)

|    |                    | Paino-% |
|----|--------------------|---------|
| 15 | MW > 5 000         | 0 - 1   |
|    | 5 000 > MW > 1 500 | 15 - 35 |
|    | 1 500 > MW > 500   | 40 - 60 |
|    | 500 > MW           | 15 - 35 |

20 ja että vapaiden aminohappojen määrä on alle 10 % ja lukukeskimääräinen suhteellinen moolimassa (Mn) on 400 - 650.

Proteiinihydrolysaateissa olevien peptidien MW-jakautuma määritetään seuraavasti.

#### 1. Periaate

Näyte laimennetaan, suodatetaan ja ruiskutetaan geelikromatografisessa (GPC) toimintamuodossa käytettävään neste-kromatografiajärjestelmään. Tämä erotusmenetelmä perustuu siihen, että siinä käytetään nesteen kulkeutumista sellaisilla huokoisilla partikkeleilla täytetyn pylvään läpi, joissa olevien huokosten läpimitta on tarkkaan rajattu. Suhteelliselta moolimassaltaan erisuuruisia peptidejä sisältävän liuoksen kulkeutuessa pylvään läpi kykenevät pienet  
30 peptidit kulkeutumaan huokosiin, kun taas näitä suuremmat

peptidit eivät kykene tähän. Liuoksessa olevat peptidit erottuvat siten molekyylin koon (ja suhteellisen moolimassan) mukaisesti, koska suuremmat peptidit eluoituvat pylväästä pienempiä peptidejä nopeammin. Pylväästä ulos tulevaa nestettä tarkkaillaan jatkuvasti pylvään ulostulon kohdalla olevalla detektorilla. Kromatografiajärjestelmä kalibroidaan peptideillä, joiden suhteellinen moolimassa on tunnettu.

## 2. Kromatografialaitteisto

### 2.1 HPLC-järjestelmä, jonka osat ovat

Korkeapainepumppu, Waters M 510, virtausnopeus 0,7 ml minuutissa

Injektori, Waters WISP M 710

Detektori, Waters M 440, varustettuna lisälaitteella, joka laajentaa aallonpituusalueen 214 nm:ään.

2.2 GPC-pylväs, 3 x TSK G 2000 SWXL, 7,8 mm x 300 mm, peräkkäin yhdistettynä, jota käytetään ympäristön lämpötilassa.

2.3 Integrointi/tulostenkäsittely, Waters 820 MAXIMA SIM-kromatografinen tietojenkäsittelyjärjestelmä, joka on varustettu 810/820 GPC -yksiköllä.

## 3. Reagenssit

3.1 Fosfaattipuskuri  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

3.2 Ammoniumkloridi  $\text{NH}_4\text{Cl}$

3.3 Trifluorietikkahappo (TFA),  $\text{CF}_3\text{COOH}$

3.4 Asetonitriili,  $\text{CH}_3\text{CN}$

3.5 Liikkuva faasi: 0,05-molaarinen fosfaattipuskuri/0,5-molaarinen ammoniumkloridiliuos, joka sisältää 0,1 % TFA:ta ja 25 % asetonitriiliä.

## 4. Kuvaus

### 4.1 Kalibrointi

Kromatografiajärjestelmä kalibroidaan ruiskuttamalla järjestelmään useita peptidistandardeja, joiden suhteelliset

moolimassat ovat tunnettuja. Kunkin standardin suhteellinen moolimassa merkitään puolilogaritmiseen kuvaajaan kohtaan, joka vastaa sitä havaittua liikkuvan faasin tilavuutta, joka tarvittiin peptidin eluoimiseen pylväästä. Havainto-

5 pisteisiin parhaiten sopiva kolmannen kertaluokan polynomi määritetään pienimmän neliösumman menetelmällä. Tämä käyrä on kalibrointikäyrä.

#### 4.2 Analyysi

10 Näyte laimennetaan/liuotetaan liikkuvaan faasiin siten, että sen konsentraatioksi saadaan noin 5 mg/ml. Liuos suodatetaan 22  $\mu$ m suodattimen läpi ja sitä injektoidaan 20  $\mu$ l kromatografialaitteeseen. Detektorivastetta eluutiotilavuuden suhteen seurataan piirturilla. Piirturin käyrä - kromatogrammi - esittää näytteen todellisen MW-jakautuman. Jotta

15 kromatogrammista voitaisiin laskea kertynyt massajakautuma ja keskimääräinen suhteellinen moolimassa, se jaetaan pieniin segmentteihin aikaa (ja eluutiotilavuutta) esittävällä akselilla ja kutakin segmenttiä kuvaa sen eluutiotilavuus ja

20 sen ala kromatogrammista tällä aikavälillä.

#### 5. Laskutoimitukset

Tulokset on esitetty paino- ja lukukeskimääräisinä suhteellisina moolimassoina.

25

$$\overline{M}_w = \frac{\sum_i (A_i \cdot M_{w,i})}{\sum_i A_i} \quad , \quad \overline{M}_n = \frac{\sum_i A_i}{\sum_i (A_i / M_{w,i})}$$

$\overline{M}_w$ : Painokeskimääräinen suhteellinen moolimassa

$\overline{M}_n$ : Lukukeskimääräinen suhteellinen moolimassa

$A_i$ : Kutakin segmenttiä vastaava kromatogrammin ala, joka on määritetty kertyneenä detektorivasteena kunkin ajanjakson aikana.

- 5  $M_{w,i}$ : Kutakin segmenttiä vastaava suhteellinen moolimassa. Arvo lasketaan kalibrintikäyrän avulla käyttäen keskimääräistä eluutiotilavuutta ajanjakson aikana.

10 Tämän keksinnön mukaisen kaseiinihydrolysaatin edulliselle sovellutusmuodolle on tunnusomaista, että kaseiinihydrolysaatti on valmistettu renniinillä saostetusta kaseiinista ja että se sisältää peptidejä, joiden suhteelliset määrät vastaavat seuraavaa MW-jakautumaa (MW on suhteellista moolimassaa vastaava lyhenne):

Paino-%

|       |              |         |
|-------|--------------|---------|
|       | MW > 5 000   | 0 - 0,2 |
|       | MW > 3 000   | < 5     |
| 5 000 | > MW > 1 500 | 15 - 35 |
| 1 500 | > MW > 500   | 40 - 60 |
| 500   | > MW         | 15 - 35 |

15

ja vapaiden aminohappojen määrä on alle 10 % ja että lukukeskimääräinen suhteellinen moolimassa ( $M_n$ ) on 400 - 650. Tämän keksinnön mukaisen kaseiinihydrolysaatin tässä sovellutusmuodossa hydrolysaatin suhteellinen moolimassa on erilainen, koska se sisältää suhteellisen pienen määrän pitkiä peptidejä. Suhteelliselta moolimassaltaan suurien peptidien puuttuminen vähentää antigeenisyyttä. Tämä tulos on hyvin tärkeä ajatellen renniinikaseiinista peräisin olevan hydrolysaatin käyttöä ainesosana äidinmaidonvastikkeissa, joiden antigeenisyyden halutaan olevan vähäinen. Tämä parantaa myös sulavuutta, mikä johdosta tuotteilla on pienempi taipumus aiheuttaa koliikkia. Tämä keksintö käsittää siten myös vauvanruokaformulaation tai äidin-

20

25

maidonvastikkeeseen, joka sisältää tämän sovellutusmuodon tämän keksinnön mukaisesta kaseiinihydrolysaatista.

5 Tämän keksinnön mukaisen kaseiinihydrolysaatin edulliselle sovellutusmuodolle on tunnusomaista, että kaseiinihydrolysaatti liukenee täydellisesti vesipitoiseen mediumiin, jonka pH-arvo on pH-alueella 3,5 - 7,0. Koska kaseiinihydrolysaatti liukenee täydellisesti, se soveltuu erittäin hyvin ruokavaliossa käytettävän ravinnon aines-

10 osaksi. Tämä keksintö käsittää lisäksi myös ruokavalioformulaation, joka liukenee täydellisesti, jonka pysyvyys esitetyissä matalissa pH-arvoissa on hyvä ja jossa tämän keksinnön mukaisen kaseiinihydrolysaatin tätä sovellutusmuotoa käytetään proteiinilähteenä. Tällainen täysin liukoinen ruokavalioformulaatio, joka perustuu tämän keksinnön

15 mukaisen kaseiinihydrolysaatin tähän sovellutusmuotoon, estää varsinkin tavallisissa letkuruokintatuotteissa ongelman muodostavan hyytymisen mahassa.

20 Tämän keksinnön mukaiselle kaseiinihydrolysaatin valmistusmenetelmälle on myös tunnusomaista, että

1) kaseiini tai kaseinaatti, jossa on ainakin 85 % proteiineja kuiva-aineena laskettuna, suspendoidaan/liuotetaan vesipitoiseen mediumiin liuokseksi, jonka proteiinipitoisuus on korkeintaan noin 20 % ja edullisesti korkeintaan 10 %,

2) että vaiheesta 1) peräisin oleva suspensio/liuos hydrolysoidaan yksivaiheisessa reaktiossa proteolyyttisesti DH-arvoon 15 - 35 %, ja edullisesti arvoon 22 - 28 % kolmella ryhmällä proteaaseja, jotka ovat

30 1) Bacilluksesta peräisin oleva yksi tai useampi neutraali endoproteaasi, jonka konsentraatio on ainakin 0,005 Anson-yksikköä 100 grammassa proteiinia,

2) Bacilluksesta peräisin oleva yksi tai useampi alkalinen endoproteaasi, jonka konsentraatio on ainakin 0,005 Anson-yksikköä 100 grammassa proteiinia, ja

35

3) Aspergilluksesta peräisin oleva yksi tai useampi ekso-proteaasi, jonka konsentraatio vastaa arvoa, joka on ainakin

1 000 peptidaasiyksikköä 100 grammassa proteiinia lämpötilassa, joka on alueella 45 - 60°C, menetelmällä, jossa pH:ta ei säädetä vakioarvoon,

3) että hydrolyysi lopetetaan inaktiivomalla entsyymit ja

5 4) että vaiheesta 3 peräisin oleva effluentti muunnetaan kuivaan muotoon.

10 Julkaisussa US 3 761 353 on kuvattu proteiinihydrolysaatti, jonka ollessa kyseessä raakamateriaalina voidaan käyttää maitoproteiinia. Tämän proteiinihydrolysaatin valmistuksessa saatava saanto on pienempi kuin tämän keksinnön mukaisella menetelmällä. Tässä tekniikan tason mukaisessa menetelmässä ei myöskään käytetä samaa proteolyyttisten entsyymien yhdistelmää kuin tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä.

15

20 Julkaisussa EP 384 303 on kuvattu menetelmää sellaisen proteiinihydrolysaatin valmistamiseksi, joka voi olla kaseiinihydrolysaatti. Vaikkakin tämän kaseiinihydrolysaatin kitkeytyys on pieni, on esitetty, että DH:n arvo on suuruusluokkaa 4,4 %, kun taas tämän keksinnön mukaisen menetelmän ollessa kyseessä DH on 15 - 35 %. Myös pH säilytetään hydrolyysin aikana vakiona, mikä käy ilmi sivun 6 riviltä 35, kun taas tämän keksinnön mukainen hydrolyysi suoritetaan reaktiona, jossa pH:ta ei säädetä vakioarvoon.

25

30 Julkaisussa EP 223 560 on kuvattu peräkkäiseen hydrolyysiin perustuva menetelmä sellaisen proteiinihydrolysaatin valmistamiseksi, joka voi olla kaseiinihydrolysaatti. Tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä käytettävä hydrolyysi on yksivaiheinen reaktio, eikä tässä tekniikan tason mukaisessa menetelmässä myöskään ole kuvattu sitä nimenomaista proteolyyttisten entsyymien yhdistelmää, jota käytetään tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä.

35

Julkaisussa US 4 600 588 on kuvattu maitoproteiinihydrolysaatti, joka valmistetaan toisella proteolyyttisten entsyymien yhdistelmällä kuin tämän keksinnön mukaisessa

menetelmässä käytetty proteolyyttisten entsyymien yhdistelmä. Tätä tekniikan tason mukaista maitoproteiinihydrolysaattia käytetään myös emulgaattorina, kun taas tämän keksinnön mukaista kaseiinihydrolysaattia käytetään elintarvikelisiä aineena.

On selvää, että termiin "Bacilluksesta peräisin oleva neutraali endoproteaasi" kuuluu mikä tahansa Bacilluksen tuottama neutraali endoproteaasi sekä proteaasit, jotka ovat samanlaisia kuin tähän entsyymiryhmään kuuluvat entsyymit ja jotka on tuotettu kloonaamalla muissa isännissä. Tätä tulkintaa on myös käytettävä silloin, kun kyseessä ovat samantyyppiset termit, esimerkiksi termi "Aspergilluksesta peräisin oleva eksoproteaasi".

Tyypillinen esimerkki Bacilluksesta peräisin olevasta neutraalista endoproteaasista on Novo Nordisk A/S -yhtiön tuottama Neutrase®, tyypillisiä esimerkkejä Bacilluksesta peräisin olevista alkalisista endoproteaaseista ovat Novo Nordisk A/S -yhtiön tuottamat Alcalase®, Esperase® ja Savinase®, ja tyypillinen esimerkki Aspergilluksesta peräisin olevasta eksoproteaasista on Novo Nordisk A/S -yhtiön tuottama Novozym® 515.

Näiden kolmen entsyymin konsentraatioille ei ole esitetty mitään ylärajaa, mutta on selvää, että ylärajat muodostuvat sen perusteella, että ei ole haluttua käyttää sellaista entsyymimäärää, joka heikentää tuotteen organoleptisiä ominaisuuksia tai jolla menetelmästä tulee taloudellisesti epäedullinen.

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän ollessa kyseessä voidaan organoleptisten ominaisuuksien parantamiseksi suorittaa hiilikäsittely. Tämä hiilikäsittely voidaan suorittaa erillisenä vaiheena tai jonkin olemassa olevan vaiheen yhteydessä. Mikäli menetelmässä käytetään ultrasuodatusta, voidaan hiili lisätä missä tahansa valitussa vaiheessa ennen ultra-

suodatusta, ja käytetty hiili erottuu automaattisesti reaktioseoksesta ultrasuodatusvaiheessa, koska haluttu tuote on permeaatti. Mikäli ei suoriteta ultrasuodatusta, on hiilikäsittely tehtävä erillisenä vaiheena.

5

Entsyymit (vaihe 3) voidaan inaktivoida alentamalla pH-arvoa, joka alennetaan edullisesti suunnilleen arvoon 4,5, minkä johdosta lopputuote soveltuu suoraan lisäaineeksi virkistysjuomaan, esimerkiksi appelsiinimehuun, ja/tai entsyymit voidaan inaktivoida kohottamalla lämpötilaa. Mikäli entsyymit inaktivoidaan pH-arvoa alentamalla, on organoleptisten ominaisuuksien parantamiseksi suoritettava hiilikäsittely havaittu tarpeettomaksi.

10

15

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän edulliselle sovellutusmuodolle on tunnusomaista, että vaiheen 2 kolme proteaasiryhmää ovat

1) Bacillus subtiliksen yksi tai useampi neutraali endoproteaasi,

20

2) Bacillus licheniformiksen yksi tai useampi alkalinen endoproteaasi ja

3) Aspergillus oryzaen yksi tai useampi eksoproteaasi.

25

On havaittu, että tämän sovellutusmuodon mukaisesti tuotetun kaseiinihydrolysaatin organoleptiset ominaisuudet ovat erinomaiset.

30

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän edulliselle sovellutusmuodolle on tunnusomaista, että vaiheesta 2) peräsin oleva seos erotetaan ultrasuodatus/mikrosuodatuslaitteessa ennen vaiheessa 3) olevan hydrolyysin lopettamista tai vaiheessa 3) olevan hydrolyysin lopettamisen jälkeen, ja permeaatti muodostaa kaseiinihydrolysaatin. Näin menetellen saadaan valmistettua täydellisesti liukenevaa kaseiinihydrolysaattia. Koska ultrasuodatusmembraanit, joiden päästöraja on alle 5 000, ovat hyvin harvinaisia ja koska ainoastaan 1 % kaseiinihydrolysaatista ylittää MW-arvon

35

5000, ei tässä sovellutusmuodossa käytetyn ultrasuodatusmembraanin päästörajalla ole periaatteessa mitään merkitystä. Tätä arvoa suuremmat päästörajan arvot ovat kuitenkin suuremman virtauksen johdosta edullisia.

5

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän edulliselle sovellutusmuodolle on tunnusomaista, että hydrolyysivaihe 2) jää alle 6 tunnin pituiseksi. Tässä sovellutusmuodossa ei ole tarpeellista esikäsitellä raakamateriaalia mikrobiologisen pysyvyyden aikaansaamiseksi.

10

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän edulliselle sovellutusmuodolle on ominaista, että entsyymit inaktivoidaan käsittelemällä niitä elintarvikelaatuluokkaa olevalla hapolla, edullisesti suolahapolla tai sitruunahapolla. Tämä sovellutusmuoto on yksinkertainen eikä siinä tarvitse käyttää puhdistustarkoituksiin soveltuvaa hiiltä ja sillä voidaan myös tuottaa tuote, jonka pH-arvo veteen liuotettuna on mikä tahansa välillä 3,5 - 7,0 oleva arvo.

15

20

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän edulliselle sovellutusmuodolle on ominaista, että entsyymit inaktivoidaan lämpökäsittelyllä ja että vaiheesta 3 peräisin oleva effluentti käsitellään aktiivihiehillä, joka myöhemmässä vaiheessa erotetaan, kun taas vaiheena 4 muutetaan vaiheesta 3 saatu effluentti, joka ei enää sisällä aktiivihiehiä, kuivaan olomuotoon. Tämä kaseiinihydrolysaatti soveltuu erityisen hyvin ainesosaksi vauvanruokaan.

...

25

30

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän edulliselle sovellutusmuodolle on ominaista, että vaiheessa 4 käytetään hypersuodatuksen ja/tai haihdutuksen sisältävää yhdistelmää, minkä jälkeen tuote sumutuskuivataan. Hypersuodatus on halvin keino tuotteen konsentroimiseksi arvoon 20 - 30 °B ja sillä voidaan myös poistaa haitallisia suoloja. Sumutuskuivauksesta saadaan helposti käsiteltävä lopputuote.

...

35

Tämän keksinnön mukaiselle edulliselle sovellutusmuodolle on ominaista, että lähtömateriaalina käytetään hapolla saostettua kaseiinia, ja että tämä liuotetaan emäksellä. Tässä sovellutusmuodossa käytetään halvinta käytettävissä olevaa raakamateriaalia.

Tämän keksinnön mukaiselle edulliselle sovellutusmuodolle on ominaista, että saostettu kaseiini liuotetaan  $\text{Ca(OH)}_2$ :n avulla. Tästä sovellutusmuodosta saadaan kaseiinihydrolysaattilopputuote, jonka organoleptiset ominaisuudet ovat erinomaiset.

Tämän keksinnön mukaisen menetelmän edulliselle sovellutusmuodolle on ominaista, että siinä käytetään lähtömateriaalina renniinillä saostettua kaseiinia ja että tämä liuotetaan natriumfosfaatilla tai natriumkarbonaatilla. Tässä sovellutusmuodossa hydrolysaatin suhteellinen moolimassa on erilainen, koska se sisältää suhteellisen pienen määrän pitkiä peptidejä. Tämä tulos on hyvin tärkeä ajattelun renniinikaseiinista peräisin olevan hydrolysaatin käyttämistä ainesosana äidinmaidonvastikkeissa, joiden anti-geenisyyden halutaan olevan pieni. On havaittu, että lopputuotteen suhteellisen moolimassan jakautuma on seuraava.

Paino-%

|                    |         |
|--------------------|---------|
| MW > 5 000         | 0 - 0,2 |
| MW > 3 000         | < 5     |
| 5 000 > MW > 1 500 | 15 - 35 |
| 1 500 > MW > 500   | 40 - 60 |
| 500 > MW           | 15 - 35 |

ja vapaiden aminohappojen määrä on alle 10 % ja lukukeskimääräinen suhteellinen moolimassa ( $M_n$ ) on 400 - 650.

Tämän keksinnön mukaiselle edulliselle sovellutusmuodolle on tunnusomaista, että renniinillä saostettu kaseiini liuote-

taan natriumfosfaatilla tai natriumkarbonaatilla. Tässä sovellutusmuodossa saadaan hydrolyysi tapahtumaan nopeasti ja sillä saadaan suuri saanto. Tätä keksintöä kuvataan käyttäen seuraavia esimerkkejä.

5

#### Esimerkki 1

Hydrolyysin raakamateriaali oli MD-Foods Denmark -yhtiöstä saatua Ca-kaseinaattia (Miprodan 40), joka sisälsi noin 87 % proteiinia. Tämä kaseinaatti suspendoitiin deionisoituun veteen 8-prosenttiseen proteiinikonsentraatioon 50 °C:ssa. Tämän tuloksena saatiin seuraavat pH-, osmolaalisuus- ja Brix-arvot: pH = 6,96, osmolaalisuus = 24 mOsm/kg ja °Brix = 7,20. Seokseen lisätyt entsyymit olivat:

- Neutrase® 0.5L, jonka määrä oli 2 % proteiinista
- 15 -Alcalase® 2.4L, jonka määrä oli 0,5 % proteiinista
- Novozym® 515, jonka määrä oli 0,8 % proteiinista.

Hydrolyysi suoritettiin 6 tunnin aikana 50 °C:ssa seuraten pH- osmolaalisuus- ja Brix-arvoja. Hydrolyysin päättyessä pH oli 5,91, osmolaalisuus 222 mOsm/kg, Brix 12,00 °B ja DH 26,2 %. Hydrolyysi lopetettiin kuumentamalla seosta 3 minuuttia 85°C:ssa.

20

Hydrolyysiseos erotettiin käyttäen PCI-ultrasuodatus-laitteistoa, johon oli asetettu FP100-membraanit (päästö-  
25 rajan MW = 100 000). UF:n jälkeen saatu saanto oli > 93 % raakamateriaalin proteiinimäärän perusteella ilmoitettuna. Lopputuote konsentroitiin PCI-nanosuodatuslaitteen avulla, johon oli asetettu AFC30-membraanit. Kokonaissaanto tämän valmistusvaiheen jälkeen oli 90,7 %. Konsentraatti sumutus-  
30 kuivattiin.

30

Saatu tuote oli täysin liukoinen jauhe, joka sisälsi 91 % kuiva-ainetta ja jonka suhteellisten moolimassojen jakauma oli kuvion 1 mukainen. Keskimääräinen Mn = 516. Vapaat aminohapot = 7 %. Tuote oli täysin liukoinen pH-alueella

35

3,5 - 7,0. Tuotteen 5-prosenttisen liuoksen pH-arvo oli 6,45.

#### Esimerkki 2

5 Hydrolyysiin käytetty raakamateriaali oli MD-Foods Denmark -yhtiöstä saatua Ca-kaseinaattia (Miprodan 40), joka sisälsi noin 87 % proteiinia. Kaseinaatti suspendoitiin 8-prosenttiseen proteiinikonsentraatioon deionisoituun veteen, jonka lämpötila oli 50 °C. Tuotteesta otettiin pH-, osmolaalisuus- ja Brix-lukemat: pH = 6,96, osmolaalisuus = 24 mOsm/kg ja °Brix = 7,20. Seokseen lisätyt entsyymit olivat:

- Neutrase® 0.5L, jonka määrä oli 2,0 % proteiinista
- Alcalase® 2.4L, jonka määrä oli 0,5 % proteiinista
- Novozym® 515, jonka määrä oli 0,8 % proteiinista

15

Seosta hydrolysoitiin 6 tuntia 50 °C:ssa seuraten sen pH:ta, osmolaalisuutta ja Brix-arvoa. Hydrolyysin päätyttyä pH oli 5,91, osmolaalisuus 222 mOsm/kg, Brix-arvo li 12,00 °B ja DH 26,2 %. Hydrolyysi lopetettiin 3 minuutin pituisella lämpökäsittelyllä 85 °C:ssa. Seokseen lisättiin aktiivihiihtä (Picatif 120 EW) käyttäen annoksena 4 % °B:stä.

20

Hydrolyysiseos erotettiin PCI-ultrasuodatuslaitteistolla, joka oli varustettu FP100-membraaneilla (päästörajan MW oli 100 000) UF:n jälkeen saatu saanto oli >93 % raakamateriaalissa olleen proteiinin perusteella ilmoitettuna. Tuote konsentroitiin PCI-nanosuodatuslaitteistolla, joka oli varustettu ACF30-membraaneilla. Kokonaissaanto tämän valmistusvaiheen jälkeen oli 90,7 %. Konsentraatti sumutuskuivattiin.

30

Saatu tuote oli täydellisesti liukeneva jauhe, joka sisälsi kuiva-aineesta 91 % proteiinia ja jonka suhteellisten moolimassojen jakautuma oli kuvion 2 mukainen. Keskimääräinen Mn = 564. Vapaat aminohapot = 7 %. Tämän tuotteen makua kuvattiin miedommaksi kuin esimerkistä 1 saadun tuotteen maku.

35

Tuote on täysin liukoinen pH-alueella 3,5 - 7,0. Tuotteen 5-prosenttisessa liuoksessa oleva pH oli 6,38.

### Esimerkki 3

- 5 Hydrolyysiin käytetty raakamateriaali oli MD-Foods Denmark -yhtiöstä saatua renniinikaseinaattia (Miprodan 26), joka sisälsi noin 87 % proteiinia. Kaseiini suspendoitiin de-ionisoituun veteen 8-prosenttiseen proteiinikonsentraatioon 75 °C:ssa. Seokseen lisättiin kaseiinin solubilisoimiseksi
- 10 2 % dinatriumdifosfaattia ja 1 % mononatriumdifosfaattia proteiinin määrän perusteella ilmoitettuna. Materiaali solubilisoitui täydellisesti 60 minuutissa. Seos jäähdytettiin 50 °C:een. Tuotteesta otettiin pH-, osmolaalisuus- ja Brix-lukemat: pH = 6,95, osmolaalisuus = 40 mOsm/kg ja
- 15 °Brix = 11,4. Seokseen lisätyt entsyymit olivat:
- Neutrase® 0.5L, jonka määrä oli 2,0 % proteiinista
  - Alcalase® 2.4L, jonka määrä oli 0,5 % proteiinista
  - Novozym® 515, jonka määrä oli 0,5 % proteiinista
- 20 Seosta hydrolysoitiin 6 tuntia 50 °C:ssa seuraten sen pH:ta, osmolaalisuutta ja Brix-arvoa. Hydrolyysin päätyttyä pH oli 6,15, osmolaalisuus oli 211 mOsm/kg ja Brix-arvo oli 12,00 °B. Hydrolyysi lopetettiin 3 minuutin pituisella lämpökäsittelyllä 85 °C:ssa.
- 25 Hydrolyysiseos erotettiin PCI-ultrasuodatuslaitteistolla, joka oli varustettu FP100-membraaneilla (päästörajan MW oli 100 000). UF:n jälkeen saatu saanto oli >80 % raakamateriaalissa olleen proteiinin perusteella ilmoitettuna.
- 30 Tuote konsentroitiin PCI-nanosuodatuslaitteistolla, joka oli varustettu ACF30-membraaneilla. Kokonaissaanto tämän valmistusvaiheen jälkeen oli 77,5 %. Konsentraattiin lisättiin aktiivivihiiltä (Picatif 120EW) käyttäen annoksena 4 % °B:stä, jonka jälkeen tämä suodatettiin tasosuodattimella ja sumutuskuivattiin.
- 35

Saatu tuote oli täydellisesti liukeneva jauhe, joka sisälsi kuiva-aineesta 91,3 % proteiinia ja jonka suhteellisten moolimassojen jakautuma oli kuvion 3 mukainen. Keskimääräinen  $M_n = 496$ . Vapaat aminohapot = 5 %. Tämän tuotteen makua kuvattiin vähän aromikkaammaksi kuin esimerkistä 1 saadun tuotteen maku. Tuote on täysin liukoinen pH-alueella 3,5 - 7,0. Tuotteen 5-prosenttisessä liuoksessa oleva pH oli 6,50.

#### 10 Esimerkki 4

Hydrolyysiin käytetty raakamateriaali oli MD-Foods Denmark -yhtiöstä saatua Na-kaseinaattia (Miprodan 30), joka sisälsi noin 87 % proteiinia. Kaseinaatti suspendoitiin deionisoituun veteen 8-prosenttiseen proteiinikonsentraatioon 50 °C:ssa. Seokseen lisätyt entsyymit olivat:

- Neutrase® 0.5L, jonka määrä oli 2,0 % proteiinista
- Alcalase® 2.4L, jonka määrä oli 0,5 % proteiinista
- Novozym® 515, jonka määrä oli 0,8 % proteiinista

20 Seosta hydrolysoitiin 6 tuntia 50 °C:ssa. Suoritettiin rinnakkainen hydrolyysikoe samoissa olosuhteissa. Ainoa ero oli se, että tässä käytettiin Ca-kaseinaattia (Miprodan 40). Seoksen maun arviointi hydrolyysin, lämpökäsittelyn ja suodatuksen jälkeen osoitti, että Ca-kaseinaatista valmistettu hydrolysaatti oli aromiprofiililtaan merkittävästi heikompi kuin Na-kaseinaatista valmistettu hydrolysaatti.

Tuote liukeni täydellisesti pH-alueella 3,5 - 7,0.

#### 30 Esimerkki 5

Jotta solubilisoinnin vaikutusta hydrolyysin tehokkuuteen olisi kyetty tutkimaan, verrattiin hydrolysoitumisnopeuksia renniinikaseiinia raakamateriaalina käyttäen.

Hydrolyysiin käytetty raakamateriaali oli MD-Foods Denmark -yhtiöstä saatua renniinikaseiinia (Miprodan 26), joka sisälsi noin 87 % proteiinia. Kaseiini suspendoitiin deionisoituun veteen 8-prosenttiseen proteiinikonsentraatioon

75 °C:ssa. Seokseen lisättiin kaseiinin solubilisoimiseksi 2 % dinatriumdifosfaattia ja 1 % mononatriumdifosfaattia proteiinin määrän perusteella ilmoitettuna. Materiaali solubilisoitui täydellisesti 60 minuutissa. Seos jäädytettiin 50 °C:een.

Seosta hydrolysoitiin 4 tuntia seuraamalla sen osmolaalisuutta. Rinnakkainen hydrolyysi suoritettiin samoissa olosuhteissa mutta ilman fosfaattia. Hydrolysoitumisnopeus oli merkittävästi pienempi, mikä käy ilmi kuviosta 4. Tämä korreloi myös saannon kohoamiseen, kun renniinikaseiini solubilisoidaan fosfaatilla ennen hydrolysointia.

#### Esimerkki 6

Hydrolyysiin käytetty raakamateriaali oli MD-Foods Denmark -yhtiöstä saatua Ca-kaseinaattia (Miprodan 40), joka sisälsi noin 87 % proteiinia. Kaseinaatti suspendoitiin deionisoituun veteen 8-prosenttiseen proteiinikonsentraatioon 50 °C:ssa. Tuotteesta otettiin pH-, osmolaalisuus- ja Brix-lukemat: pH = 6,86, osmolaalisuus = 25 mOsm/kg ja °Brix = 8,40. Seokseen lisätyt entsyymit olivat:

- Neutrase® 0.5L, jonka määrä oli 2,0 % proteiinista
- Alcalase® 2.4L, jonka määrä oli 0,5 % proteiinista
- Novozym® 515, jonka määrä oli 0,8 % proteiinista

Seosta hydrolysoitiin 6 tuntia 50 °C:ssa seuraten sen pH:ta, osmolaalisuutta ja Brix-arvoa. Hydrolyysin päätyttyä pH oli 5,92, osmolaalisuus 212 mOsm/kg, Brix-arvo 11,40 °B ja DH 26,1 %. Hydrolyysi lopetettiin laskemalla pH arvoon 4,5 30-prosenttisella HCl:llä, jonka jälkeen suoritettiin 3 minuutin pituinen lämpökäsittely 75 °C:ssa.

Hydrolyysiseos erotettiin PCI-ultrasuodatuslaitteistolla, joka oli varustettu FP100-membraaneilla (päästörajan MW = 100 000). UF:n jälkeen saatu saanto oli >84,7 % raakamateriaalissa olleen proteiinin perusteella ilmoitettuna. Tämä tulos saatiin diafiltraatiota optimoimatta.

Tuote konsentroitiin PCI-nanosuodatuslaitteistolla, joka oli varustettu ACF30-membraaneilla. Kokonaissaanto tämän valmistusvaiheen jälkeen oli 79,7 %. Konsentraatti sumutus-  
5 kuivattiin. Saatu tuote oli täydellisesti liukeneva jauhe, joka sisälsi kuiva-aineesta 90 % proteiinia ja jonka suhteellisten moolimassojen jakautuma oli kuvion 5 mukainen. Keskimääräinen  $M_n$  = 500. Vapaat aminohapot = 7 %. Tuotteen 5-prosenttisessä liuoksessa oleva pH oli 4,67.

#### 10 Esimerkki 7

Hydrolyysiin käytetty raakamateriaali oli MD-Foods Denmark -yhtiöstä saatua Ca-kaseinaattia (Miprodan 40), joka sisälsi noin 87 % proteiinia. Kaseinaatti suspendoitiin deionisoituun veteen 8-prosenttiseen proteiinikonsentraatioon  
15 50 °C:ssa. Seoksen pH -, osmolaalisuus- ja Brix-lukemat olivat: pH = 6,86, osmolaalisuus = 25 mOsm/kg ja °Brix = 8,40. Seokseen lisätyt entsyymit olivat:

- Neutrase® 0.5L, jonka määrä oli 2,0 % proteiinista
- Alcalase® 2.4L, jonka määrä oli 0,5 % proteiinista
- 20 - Novozym® 515, jonka määrä oli 0,8 % proteiinista

Seosta hydrolysoitiin 6 tuntia 50 °C:ssa seuraten sen pH:ta, osmolaalisuutta ja Brix-arvoa. Hydrolyysin päätyttyä pH oli  
25 5,92, osmolaalisuus 212 mOsm/kg, Brix-arvo 11,40 °B ja DH 26,1 %. Hydrolyysi lopetettiin alentamalla pH arvoon 4,5 30-prosenttisellä HCl:llä, jonka jälkeen suoritettiin 3 minuutin pituinen lämpökäsittely 75 °C:ssa.

Hydrolyysiseos erotettiin PCI-ultrasuodatuslaitteistolla, joka oli varustettu FP100-membraaneilla (päästörajan MW-arvo  
30 100 000). UF:n jälkeen saatu saanto oli >84,7 % raakamateriaalissa olleen proteiinin perusteella ilmoitettuna. Tämä tulos saavutettiin diafiltraatiota optimoimatta.

Tuote konsentroitiin ACF30-membraaneilla varustetulla PCI-nanosuodatuslaitteistolla. Kokonaissaanto tämän valmistus-  
35 vaiheen jälkeen oli 79,7 %. Konsentraattiin lisättiin

aktiivihiiiltä (Picatif 120 EW) käyttäen annoksena  
4 % °B:stä, jonka jälkeen tämä suodatettiin tasosuodattimel-  
la ja sumutuskuivattiin. Saatu tuote oli täydellisesti  
liukeneva jauhe, joka sisälsi kuiva-aineesta 89,6 % proteiini-  
5 nia ja jonka suhteellisten moolimassojen jakautuma oli  
kuvion 6 mukainen. Keskimääräinen  $M_n$  = 541. Vapaat amino-  
hapot = 7 %. Tuotteen 5-prosenttisessä liuoksessa oleva pH  
oli 4,64. Maun arviointi (kolmiotesti) ei osoittanut merkit-  
tävää eroa tämän tuotteen ja edellisestä esimerkistä, jossa  
10 ei ollut suoritettu aktiivihiiilikäsittelyä, peräisin olevan  
tuotteen välillä.

01  
02  
03  
04  
05  
06  
07  
08  
09  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100

101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200

## Patenttivaatimukset

110660

1. Kaseiinihydrolysaatti, joka ei sisällä yhtään hydroly-  
 soitumatonta kaseiinia, **tunnettu** siitä, että kaseiini-  
 5 hydrolysaatti on täysin liukoinen tai miltei täysin liukoi-  
 nen vesipitoiseen mediumiin, jonka pH-arvo on pH-alueella  
 3,5 - 7,0, sen organoleptinen laatu on hyvä, se sisältää  
 peptidejä, joiden suhteelliset määrät vastaavat MW-jakautu-  
 maa (MW on suhteellista moolimassaa tarkoittava lyhenne),  
 10 joka on:

|       |        |       | Paino-% |
|-------|--------|-------|---------|
|       | MW >   | 5 000 | 0 - 1   |
| 5 000 | > MW > | 1 500 | 15 - 35 |
| 1 500 | > MW > | 500   | 40 - 60 |
| 500   | > MW   |       | 15 - 35 |

ja vapaiden aminohappojen määrä on alle 10 %, ja lukukeski-  
 määräinen suhteellinen moolimassa (Mn) on 400 - 650.

15

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kaseiinihydrolysaatti,  
**tunnettu** siitä, että kaseiinihydrolysaatti on valmistettu  
 renniinillä saostetusta kaseiinista ja se sisältää peptide-  
 20 jä, joiden suhteelliset määrät vastaavat MW-jakautumaa (MW  
 on suhteellista moolimassaa tarkoittava lyhenne), joka on:

|       |        |       | Paino-% |
|-------|--------|-------|---------|
|       | MW >   | 5 000 | 0 - 0,2 |
|       | MW >   | 3 000 | < 5     |
| 5 000 | > MW > | 1 500 | 15 - 35 |
| 1 500 | > MW > | 500   | 40 - 60 |
| 500   | > MW   |       | 15 - 35 |

ja vapaiden aminohappojen määrä on alle 10 %, ja lukukeskimääräinen suhteellinen moolimassa (Mn) on 400 - 650.

5        3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen kaseiinihydrolysaatti, **tunnettu** siitä, että kaseiinihydrolysaatti on täysin liukoinen täydellisesti vesipitoiseen mediumiin, jonka pH-arvo on pH-alueella 3,5 - 7,0.

10       4. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaisen kaseiinihydrolysaatin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä,

1) että kaseiini tai kaseinaatti, jossa on ainakin 85 % proteiinia kuiva-aineena laskettuna, suspendoidaan/liuotetaan vesipitoiseen mediumiin liuokseksi, jonka proteiinipitoisuus on korkeintaan noin 20 % ja edullisesti korkeintaan 10 %,

15       2) että vaiheesta 1 peräisin oleva suspensio/liuos hydrolysoidaan yksivaiheisessa reaktiossa proteolyyttisesti DH-arvoon 15 - 35 %, ja edullisesti arvoon 22 - 28 %, seuraavaan kolmeen ryhmään kuuluvien proteaasien avulla, jotka ovat:

20           1) Bacilluksesta peräisin oleva yksi tai useampi neutraali endoproteaasi, jonka konsentraatio on ainakin 0,005 Anson-yksikköä 100 grammassa proteiinia,

25           2) Bacilluksesta peräisin oleva yksi tai useampi alkalinen endoproteaasi, jonka konsentraatio on ainakin 0,005 Anson-yksikköä 100 grammassa proteiinia, ja

3) Aspergilluksesta peräisin oleva yksi tai useampi eksoproteaasi, jonka konsentraatio vastaa arvoa, joka on ainakin 1 000 peptidaasiyksikköä 100 grammassa proteiinia,

30           lämpötilassa, joka on alueella 45 - 60 °C, menetelmällä, jossa pH:ta ei säädetä vakioarvoon,

3) että hydrolyysi lopetetaan inaktivoimalla entsyymit ja

4) että vaiheesta 3 peräisin oleva effluentti muunnetaan kuivaan muotoon.

35

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, vaiheessa 2 olevat kolme proteaasi-ryhmää ovat:

- 1) Bacillus subtiliksen yksi tai useampi neutraali endoproteaasi,
- 2) Bacillus licheniformiksen yksi tai useampi alkalinen endoproteaasi ja
- 3) Aspergillus oryzaen yksi tai useampi eksoproteaasi.

6. Patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheesta 2) peräisin oleva seos erotetaan ultrasuodatus/mikrosuodatuslaitteessa ennen vaiheessa 3) olevan hydrolyysin lopettamista tai vaiheessa 3) olevan hydrolyysin lopettamisen jälkeen, ja permeaatti muodostaa kaseiinihydrolysaatin.

7. Jonkin patenttivaatimuksen 4 - 6 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hydrolyysivaiheen 2) kesto on alle 6 tuntia.

8. Jonkin patenttivaatimuksen 4 - 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että entsyymit inaktivoidaan käsittelemällä niitä elintarvikelaatuluokkaa olevalla hapolla, edullisesti suolahapolla tai sitruunahapolla.

9. Jonkin patenttivaatimuksen 4 - 7 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että entsyymit inaktivoidaan lämpökäsittelyllä ja että vaiheesta 3) peräisin oleva effluentti käsitellään aktiivihiehillä, joka erotetaan myöhemmässä vaiheessa, minkä jälkeen vaiheena 4) muunnetaan vaiheesta 3) peräisin oleva effluentti, jossa ei ole aktiivihieiltä, muunnetaan kuivaan tilaan.

10. Jonkin patenttivaatimuksen 4 - 9 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaihe 4 suoritetaan hypersuodatuksen ja/tai haihdutuksen yhdistelmällä, jonka jälkeen suoritetaan sumutuskuivaus.

11. Jonkin patenttivaatimuksen 4 - 10 mukainen menetelmä patenttivaatimuksen 1 tai 3 mukaisen kaseiinihydrolysaatin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että lähtömateriaalina käy-

tetään hapolla saostettua kaseiinia ja että se liuotetaan emäksen avulla.

5 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että hapolla saostettu kaseiini liuotetaan  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :ta käyttäen.

10 13. Jonkin patenttivaatimuksen 4 - 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että lähtömateriaalina käytetään renniinillä saostettua kaseiinia ja että lähtömateriaali liuotetaan natriumfosfaatilla tai natriumkarbonaatilla.

#### Patenttkrav

15 1. Kaseinhydrolysat, som inte alls innehåller icke-hydrolyserat kasein, **kännetecknat** av att kaseinhydrolysatet är fullständig lösligt eller fullständig nästan lösligt i ett vattenhaltigt medium vars pH-värde ligger i pH-intervallet 3,5 - 7,0, dess organoleptiska kvalitet är god, det inne-  
20 håller peptider i relativa mängder vilka motsvarar MW-fördelningen (MW är en förkortning för relativ molmassa), som är:

|       |        |       | Vikt-%  |
|-------|--------|-------|---------|
|       | MW >   | 5 000 | 0 - 1   |
| 5 000 | > MW > | 1 500 | 15 - 35 |
| 1 500 | > MW > | 500   | 40 - 60 |
| 500   | > MW   |       | 15 - 35 |

25 och mängden fria aminosyror utgör mindre än 10 % och den numeriska relativa medelmolmassan (Mn) är 400 - 650.

30 2. Kaseinhydrolysat enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att kaseinhydrolysatet är framställt ur med rennin utfällt kasein och det innehåller peptider i relativa mängder vilka

motsvarar MW-fördelningen (MW är en förkortning för relativ molmassa), som är:

|       |              | Vikt-%  |
|-------|--------------|---------|
|       | MW > 5 000   | 0 - 0,2 |
|       | MW > 3 000   | < 5     |
| 5 000 | > MW > 1 500 | 15 - 35 |
| 1 500 | > MW > 500   | 40 - 60 |
| 500   | > MW         | 15 - 35 |

5 och mängden fria aminosyror utgör mindre än 10 % och den numeriska relativa medelmolmassan (Mn) är 400 - 650.

3. Kaseinhydrolysat enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att kaseinhydrolysatet är fullständigt lösligt i ett vattenhaltigt medium, vars pH-värde ligger i pH-intervallet 3,5 - 7,0.

4. Förfarande för framställning av ett kaseinhydrolysat enligt något av patentkraven 1 - 3, **kännetecknat** av att

15 1) ett kasein eller kaseinat, med åtminstone 85 % protein räknat på torrvikten, suspenderas/löses i ett vattenhaltigt medium till en lösning vars proteinhalt är högst ca 20 % och fördelaktigt högst 10 %,

20 2) suspensionen/lösningen från steg 1 hydrolyseras i en enstegsreaktion proteolytiskt till DH-värdet 15 - 35 %, och fördelaktigt till värdet 22 - 28 % med hjälp av tre grupper av proteaser vilka är:

25 1) en eller flera neutrala endoproteaser från en Bacillus i en koncentration av åtminstone 0,005 Ansonenheter/100 gram protein,

2) en eller flera alkaliska endoproteaser från en Bacillus i en koncentration av åtminstone 0,005 Ansonenheter/100 gram protein, och

- 3) en eller flera exoproteaser från en *Aspergillus* i en koncentration som motsvarar ett värde som utgör åtminstone 1000 peptidasenheter/ 100 gram protein, vid en temperatur, som ligger i intervallet 45 - 60 °C, enligt ett förfarande där pH inte regleras till ett konstant värde,
- 3) hydrolysen avslutas genom att enzymerna inaktiveras och
- 4) effluentet från steg 3 konverteras till torr form.

10

5. Förfarande enligt patentkrav 4, **kännetecknat** av att de tre proteasgrupperna i steg 2 är:

- 1) ett eller flera neutrala endoproteas av *Bacillus subtilis*,
- 2) ett eller flera alkaliska endoproteas av *Bacillus licheniformis*, och
- 3) ett eller flera exoproteas av *Aspergillus oryzae*.

15

6. Förfarande enligt patentkravet 4 eller 5, **kännetecknat** av att blandningen från steg 2) separeras i en ultrafiltrerings/mikrofiltreringsanordning före avslutandet av hydrolysen i steg 3) eller efter avslutandet av hydrolysen i steg 3) och permeatet utgörs av kaseinhydrolysat.

20

7. Förfarande enligt något av patentkraven 4 - 6, **kännetecknat** av att varaktigheten för hydrolyssteg 2) är mindre än 6 timmar.

25

8. Förfarande enligt något av patentkraven 4 - 7, **kännetecknat** av att enzymerna inaktiveras genom att behandla dem med en syra av livsmedelskvalitetsklass, fördelaktigt saltsyra eller citronsyra.

30

9. Förfarande enligt något av patentkraven 4 - 7, **kännetecknat** av att enzymerna inaktiveras medelst värmebehandling och att effluentet från steg 3) behandlas med aktivt kol som separeras i ett senare steg, varefter man i steg 4) kon-

35

verterar det aktivkolfria effluentet från 3) till ett torrt tillstånd.

5 10. Förfarande enligt något av patentkraven 4 - 9, **kännetecknat** av att steg 4) genomförs medelst en kombination av hyperfiltrering och/eller indunstning, som följs av spraytorkning.

10 11. Förfarande enligt något av patentkraven 4 - 10 för framställning av kaseinhydrolysatet enligt patentkrav 1 eller 3, **kännetecknat** av att man som utgångsmaterial använder med syra utfällt kasein och att det löses med hjälp av en bas.

15 12. Förfarande enligt patentkrav 11, **kännetecknat** av att det med syra utfällda kaseinet löses under användande av  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

20 13. Förfarande enligt något av patentkraven 4 - 10, **kännetecknat** av att man som utgångsmaterial använder med rennin utfällt kasein och att utgångsmaterialet löses med natriumfosfat eller natriumkarbonat.

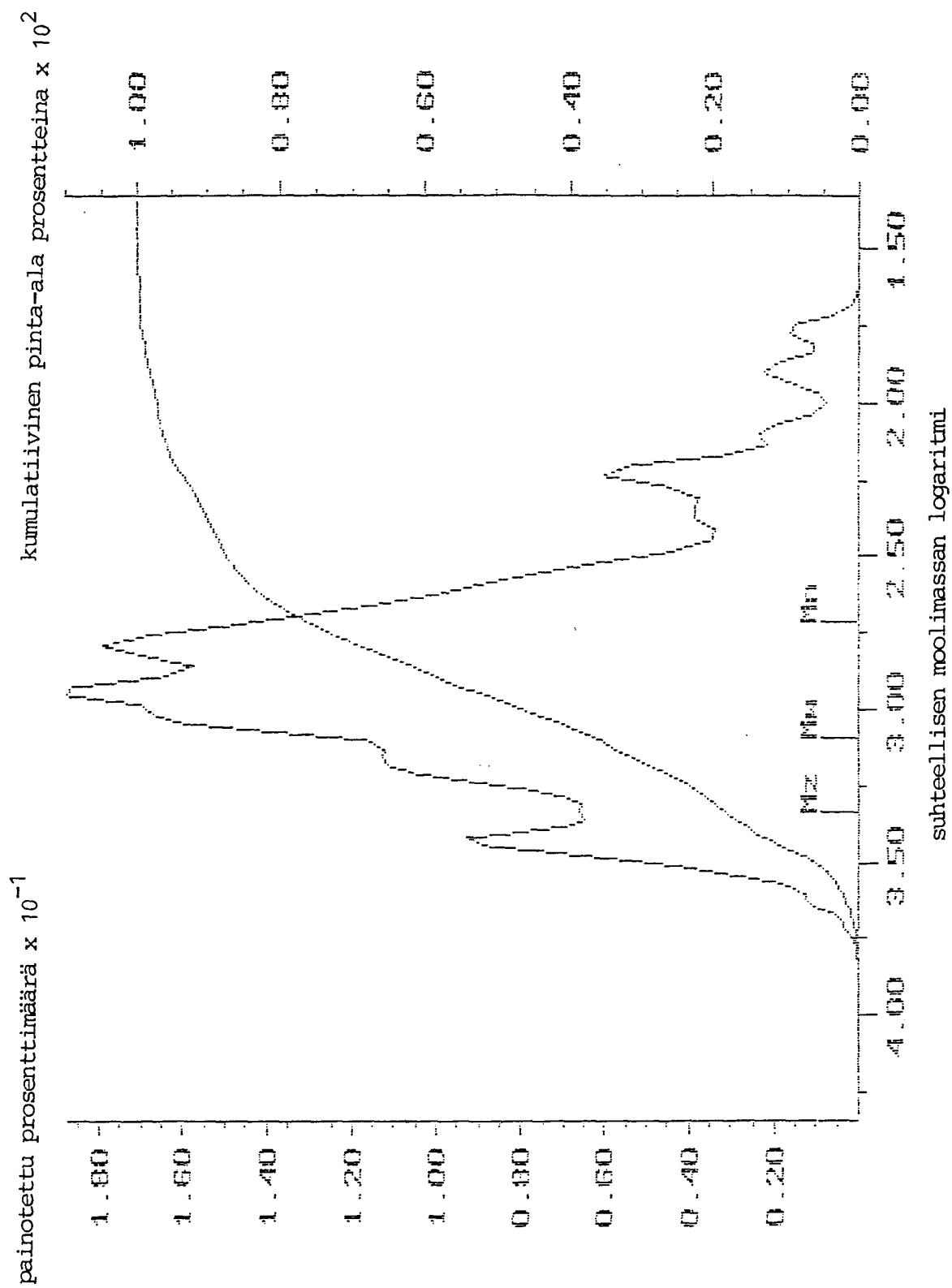


Fig. 1

08.03.84 342103

2/6

110660

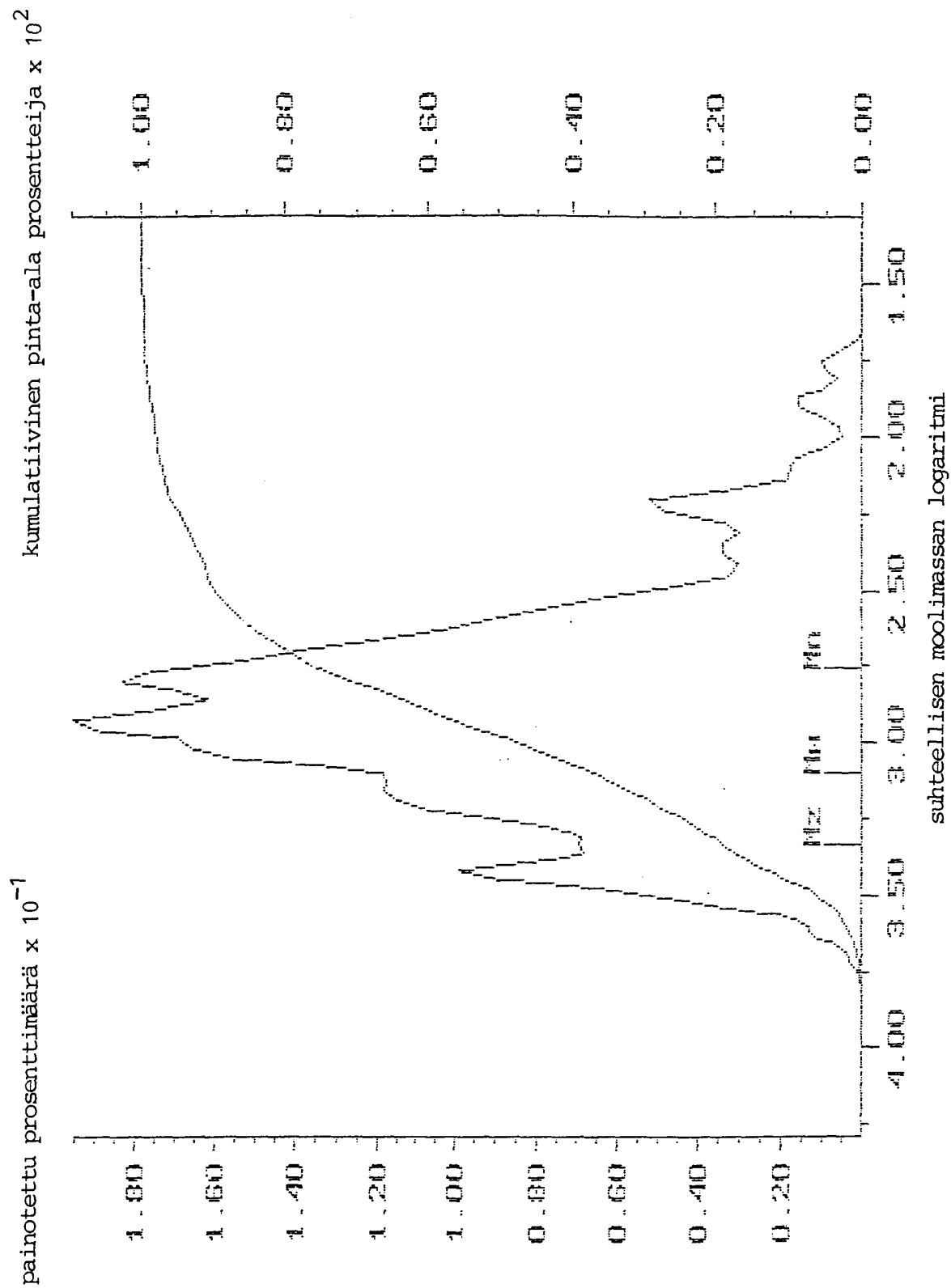


Fig. 2

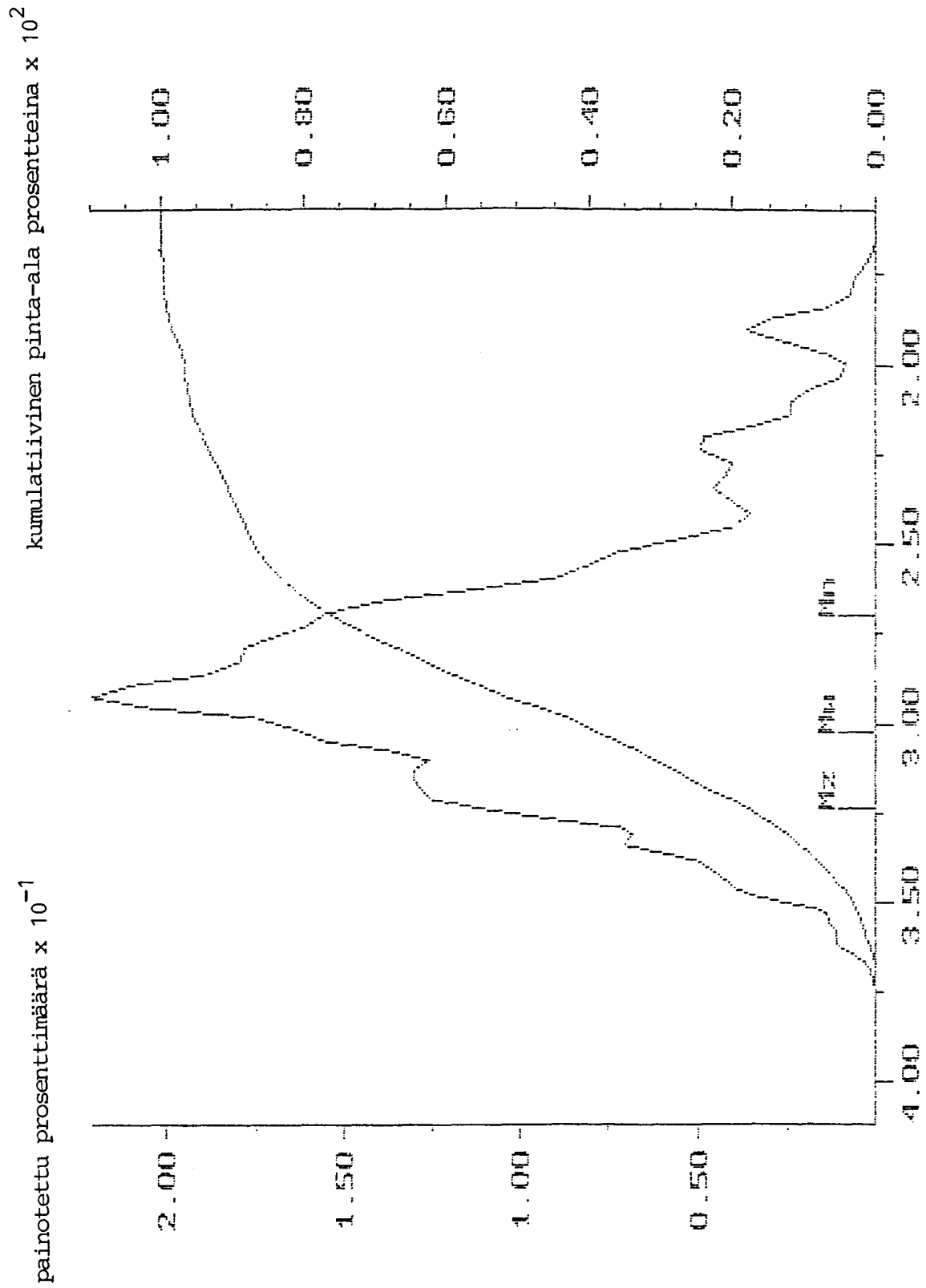


Fig. 3

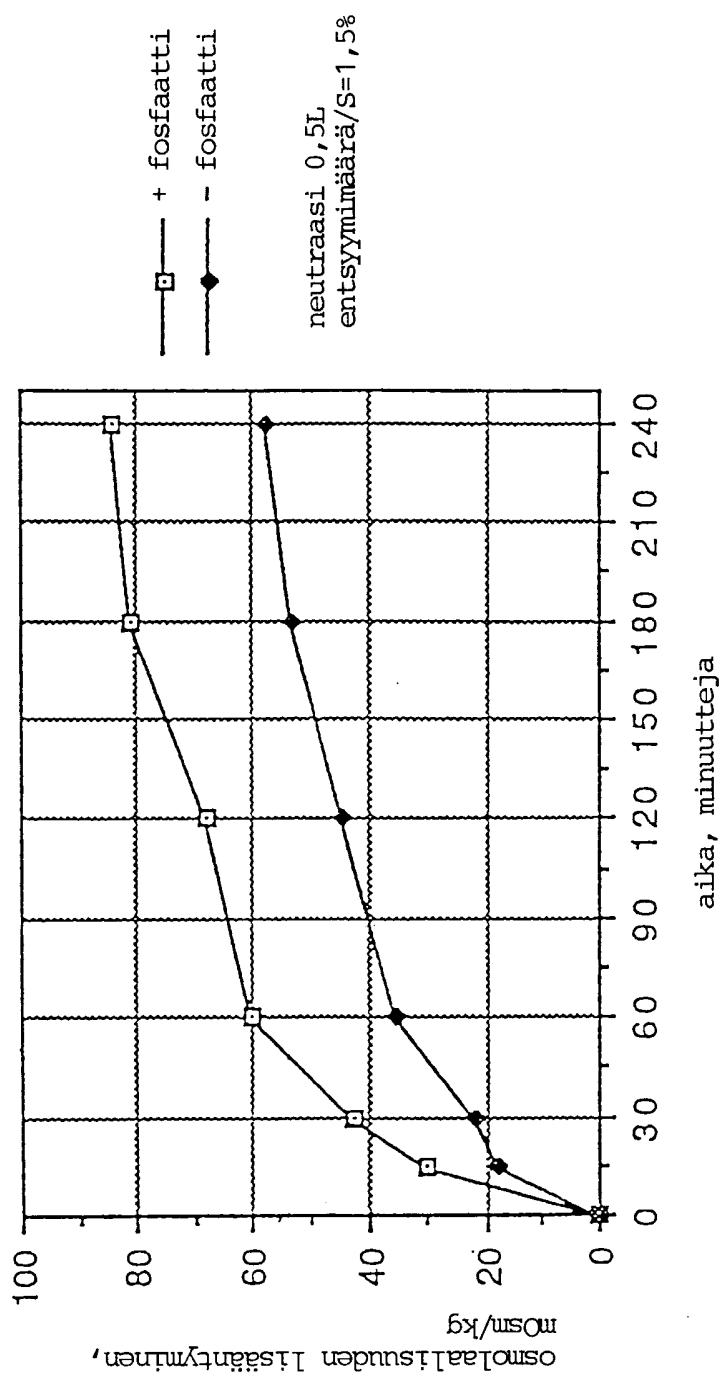


Fig. 4

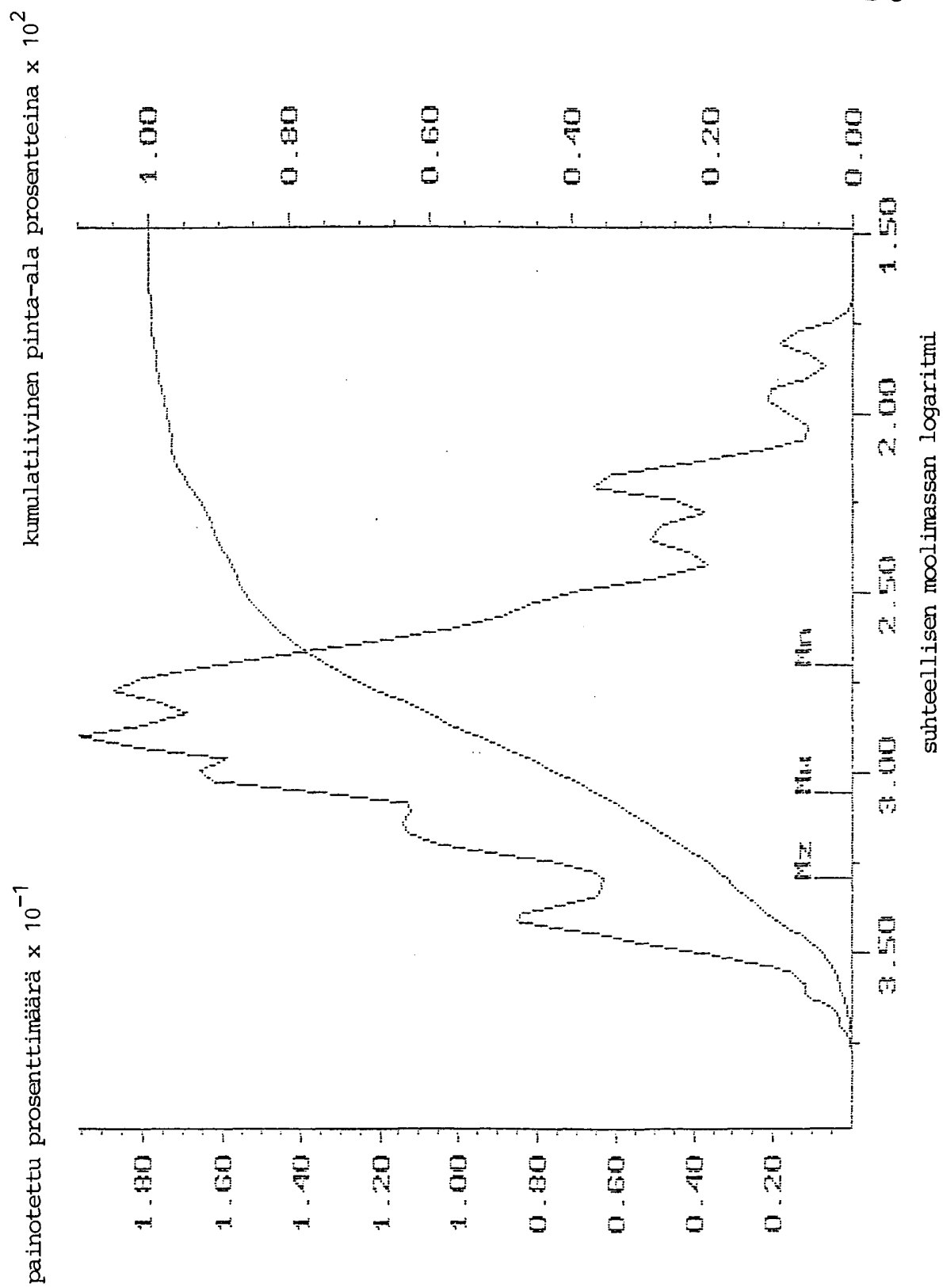


Fig. 5

08.08.84 96.2133

6/6

110660

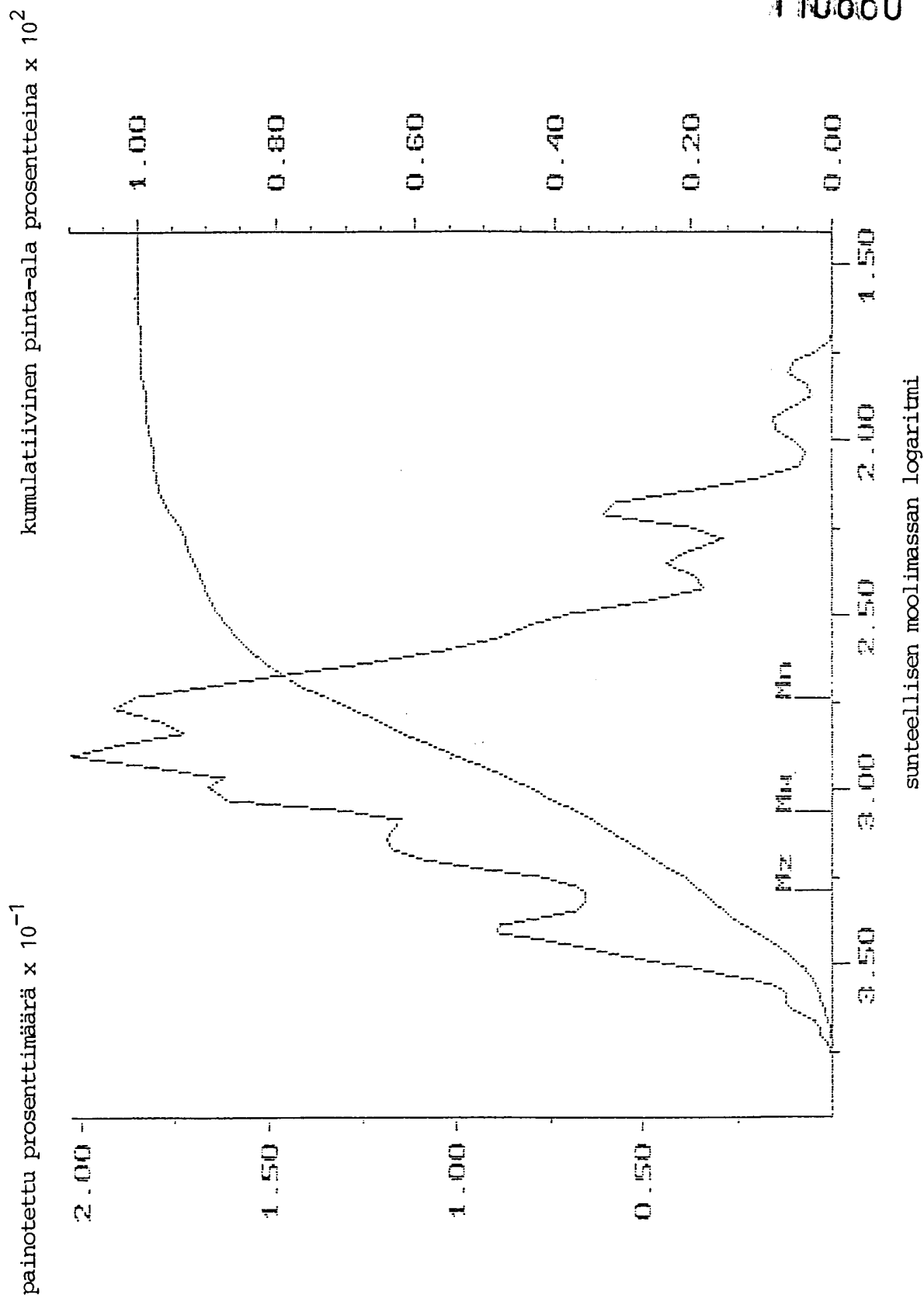


Fig. 6