



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112105267 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(21) 申请号 201980028345.9

(22) 申请日 2019.04.26

(30) 优先权数据

1853748 2018.04.27 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/060750 2019.04.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/207111 FR 2019.10.31

(71) 申请人 乐斯福公司

地址 法国巴黎

(72) 发明人 R·梅宁 P·斯波劳雷 I·穆利

(74) 专利代理机构 北京金信知识产权代理有限公司 11225

代理人 李雪芹 徐琳

(51) Int.Cl.

A23J 1/18 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

酵母蛋白质

(57) 摘要

本发明涉及一种用于获得酵母蛋白质的方法,包括以下步骤:a)提供酵母膏;b)在70至95℃的温度下使该酵母膏暴露于热质壁分离30秒至4小时,优选1分钟至3小时,更优选40分钟至2小时;b')使不溶部分和可溶部分分离;c)在40至65℃,优选60℃的温度下依次或同时使所述不溶部分经受至少一种核糖核酸酶和一种葡聚糖酶的活性8至24小时,优选18小时;d)使不溶部分与可溶部分分离;其中,在步骤d)中收集的所述不溶部分没有味道,核苷酸含量小于3%,真蛋白质含量至少为72%。步骤b')是可选的。在这种情况下,使在对酵母膏进行热质壁分离后获得的全部组合物经受酶活性。

1. 一种用于获得酵母蛋白质的方法,包括以下步骤:
 - a) 提供酵母膏;
 - b) 在70至95℃的温度下使该酵母膏暴露于热质壁分离30秒至4小时,优选1分钟至3小时,优选40分钟至2小时;
 - c) 在40至65℃,优选60℃的温度下依次或同时使整体经受至少一种核糖核酸酶和一种葡聚糖酶的活性8至24小时,优选18小时;
 - d) 使不溶部分和可溶部分分离;其中,在步骤d)收集的所述不溶部分是无味的,核苷酸含量小于3%,并且真蛋白质含量至少为72%。
2. 一种用于获得酵母蛋白质的方法,包括以下步骤:
 - a) 提供酵母膏;
 - b) 在70至95℃的温度下使该酵母膏暴露于热质壁分离30秒至4小时,优选1分钟至3小时,更优选40分钟至2小时;
 - b') 使不溶部分和可溶部分分离;
 - c) 在40至65℃,优选60℃的温度下依次或同时使所述不溶部分经受至少一种核糖核酸酶和一种葡聚糖酶的活性8至24小时,优选18小时;
 - d) 使不溶部分和可溶部分分离;其中,在步骤d)中收集的所述不溶部分是无味的,核苷酸含量小于3%,并且真蛋白质含量至少为72%。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,在步骤c)中还应用脱氨酶活性。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,所述酵母选自酵母菌、毕赤酵母、假丝酵母、克鲁维酵母、耶氏酵母、威克汉姆酵母。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述酵母选自酿酒酵母、杰丁毕赤酵母、马克斯克鲁维酵母。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中,同时使用在步骤c)中使用的酶。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中,在步骤d)中收集的不溶部分的脂质含量也高于7%。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中,将步骤d)中收集的不溶部分用乙醇、溶剂或超临界CO₂处理,以去除脂质并将真蛋白质含量提高至80%。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中,步骤a)中使用的酵母膏中含有富硒酵母。
10. 用权利要求1至9中任一项所述的方法获得的,具有至少72%的真蛋白质含量的酵母蛋白质提取物在人类营养中的用途。
11. 根据权利要求10所述的用途,其用作用于老年人或用于运动员的体重控制的食物补充剂。
12. 根据权利要求10所述的用途,其用作在饮料、面包制造产品或植物性熟食肉中的非动物性蛋白质的供应。
13. 根据权利要求10所述的用途,其用于口服或肠内临床营养。
14. 用权利要求1至9中任一项所述的方法获得的,具有至少72%的真蛋白质含量的酵

母蛋白质提取物在动物营养中的用途。

酵母蛋白质

技术领域

[0001] 本发明涉及源自微生物,更具体地源自酵母的蛋白质领域,所述蛋白质可广泛用于人和动物的营养、健康和福祉。

背景技术

[0002] 蛋白质代表人类和动物组织的主要成分。从营养的观点来看,蛋白质被蛋白酶和肽酶水解为肽和氨基酸。氨基酸为身体提供必不可少的元素,例如氮、碳水化合物和硫。身体不能固定无机氮以将其掺入有机分子中:因此,氮是由氨基酸提供的。含硫氨基酸为代谢提供了重要的硫。氨基酸也是合成蛋白质、肽和生理必需的低分子量物质(如谷胱甘肽、肌酸、多巴胺、5-羟色胺等)的必要元素。因此,对于人类和动物营养的蛋白质需求随着世界人口的增长而扩大。因此,需要寻找动物性蛋白质的其他和/或替代蛋白质源。已经从植物(谷物、豆类)或昆虫中回收蛋白质。获得微生物来源的蛋白质依赖于已有数百年历史的发酵机制。微生物蛋白质既可以是整个细胞或细胞壁的组成部分,也可以是分离的蛋白质。用于人类食物的微生物来源的蛋白质的缺点之一是分离物的核酸含量。该含量必须低,因为核酸代谢的终产物之一是尿酸,人体缺乏代谢其所需的酶尿酸酶,因此其无法降解。其他缺点例如是通过从微生物中分离获得的蛋白质的提取产率或纯度。

[0003] 细胞,例如酵母细胞,裂解后,通常是在“noble”阶段,即可溶阶段(其对应于酵母提取物并且含有味道很重的化合物)中回收蛋白质。然而,取决于获得的蛋白质提取物的预期应用,味道可能是不利的。

[0004] 同一团队的三项专利涉及浓缩蛋白质提取物的获得。

[0005] 专利US3867555公开了一种可以获得具有低核酸含量的蛋白质提取物的方法。将细胞机械破裂(高压,超声)或化学破裂(自溶,外加酶),使得蛋白质保留在可溶部分中。然而,这些蛋白质与水解产物,即与氨基酸、肽和多糖或单糖混合。离心分离并除去不溶部分后,将蛋白质沉淀,碱处理使核酸水解,随后通过过滤将其除去。但是,“未水解”蛋白质的总回收率很低。

[0006] 专利US3887431公开了在酵母裂解后在可溶部分中发现的内源核酸酶用于降解核酸的用途。真空浓缩步骤可以获得浓缩蛋白质提取物和几乎没有味道和气味的产物。

[0007] 专利US3991215公开了一种方法,在细胞破裂后,对可溶的细胞质部分施加超高温加热,这使得可以获得含有很少的核酸的富含蛋白质的提取物。

[0008] 最后,可以遵循几个方向来改进从微生物中分离蛋白质的方法,以期获得更好的纯度,更好的产量和/或可以直接用于营养或用作食品补充剂的蛋白质提取物。

发明内容

[0009] 与常规技术所采取的方向相反,本发明人已经开发了一种从微生物裂解后获得的不溶部分中分离微生物蛋白质的方法。这种新颖的方法使得可以得到浓缩的非水解蛋白质提取物,其核酸含量少,气味和味道小,并且产率高。

[0010] 本发明的方法从细胞裂解开始,优选通过热质壁分离,其导致微生物酶的失活并释放到包括谷氨酸在内的游离氨基酸的基质中。使它们经受葡聚糖酶类型的酶和核糖核酸酶类型的酶,然后分离,之后不溶部分代表具有至少72%真蛋白质含量的目标产物。在本发明的另一个实施方式中,在热质壁分离阶段之后进行第一分离,并且仅使包含蛋白质、多糖和RNA的不溶部分经受葡聚糖酶和核糖核酸酶的作用,然后再次分离以保留富含蛋白质的不溶部分。

[0011] 获得的蛋白质提取物无味道,也无气味,核酸含量低。

[0012] 可将仍然含有源自膜的脂质的蛋白质提取物用本领域技术人员已知的方法脱脂,例如用己烷或乙醇类型的溶剂,用超临界CO₂提取或通过用脂肪酶或磷脂酶处理,然后从溶解相中分离来提取。

[0013] 获得的蛋白质可直接用于营养、食品补充剂等的应用。

[0014] 定义

[0015] 微生物是指肉眼不可见但在显微镜下可见的活生物体。在本发明中,微生物优选是细菌(原核微生物)或酵母(真核微生物)。酵母,以单数或复数形式表示,是表示可引起有机物发酵的真核微生物的通用术语。在酵母中,非详尽地提及酵母菌属(*genii Saccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)。

[0016] 酵母膏是指在容器中繁殖后和在离心后获得的酵母悬浮液(所述离心使所述悬浮液与周围液体(也被称为浆(*must*))分离)。繁殖也可被称为培养,或者从广义上说,是发酵。

[0017] 蛋白质是由通过肽键连接在一起的氨基酸序列形成的大分子。它们是所有动植物细胞的主要的基本组成部分。它们最高占生物的50干重%,占我们每日能量摄入量的15%至20%。食物和身体蛋白质是氮和氨基酸的主要来源,氮和氨基酸具有几种主要的代谢功能:它们是蛋白质合成的底物,体内重要的含氮化合物(核酸、一氧化氮、谷胱甘肽等)的前体,以及能量代谢的底物。

[0018] 通常,在农业食品中,蛋白质含量被认为是氮水平乘以6.25(系数6.25源自蛋白质的平均氮含量,即100/6.25,即16%)。真蛋白质是指更接近于现实的蛋白质含量,该含量已针对非蛋白质氮(例如核酸中的氮)引起的偏差进行了校正。因此,作为公式,真蛋白质的含量可以是总氮减去核酸中的氮和氨氮后乘以6.25。或者,可以通过测定总氨基酸来评价真蛋白质的含量。完整的天然蛋白质是指以在活的微生物中被发现的状态的微生物蛋白质。通过扩展,变性的天然蛋白质通过折叠或凝结具有潜在的修饰的空间构象。蛋白质也可以部分或完全水解。

[0019] 质壁分离是指微生物,优选酵母的不透性或其隔室方面的破裂。膜渗透后会失去水分。

附图说明

[0020] 图1示出了本发明的方法的两个主要实施方式。图1A示出了在质壁分离和酶促水解之间没有分离步骤的方法。图1B示出了在质壁分离步骤之后进行分离并且对源自该分离的不溶部分进行酶促水解的方法。

[0021] 图2给出了源自本发明方法的蛋白质提取物和用于从通过质壁分离步骤获得的可

溶部分中提取蛋白质的已知方法得到的所谓的常规蛋白质提取物各自的蛋白质图谱。

具体实施方式

[0022] 本发明的方法可以应用于任何类型的酵母,更具体地,可以用于人或动物营养的任何酵母。从工业角度看,本发明的方法是对如上述定义的酵母膏,即对酵母的悬浮液实施的。优选地,酵母选自酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、假丝酵母属(*Candida*)、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)或威克汉姆酵母属(*Wickerhamomyces*)的酵母。更优选地,酵母选自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、杰丁毕赤酵母(*Pichia jadinii*) (也称为产朊假丝酵母(*Candida utilis*))、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、异常威克汉姆酵母(*Wickerhamomyces anomalus*)等。这些酵母包含6%至11%的氮。用技术人员已知的凯氏定氮法测量氮。如上所述,使用乘数系数6.25从该氮测定法中推算出真蛋白质含量。

[0023] 按照技术人员已知的方法进行酵母的培养。参考文献Gerald Reed和Tilak W.Nagodawithana的“酵母技术(Yeast technology)” (ISBN 0-442-31892-8) 第284至293页中描述了一种方案。所说的培养物(也称为生物质)是通过离心或过滤收集的并且可以洗涤。获得酵母膏。

[0024] 然后使用已知方法,例如高压均质化、机械研磨、超声崩解、反复的冻融循环、渗透压冲击或酶促裂解,对细胞进行机械或化学破裂。在本发明的一个优选的实施方式中,根据酵母类型使酵母在70至95℃的温度下进行热质壁分离。温度优选在80至90℃之间。在本领域技术人员能够想到的范围内调节温度和/或裂解时间,例如,由于细胞和/或酶的抗性功能,希望在该步骤中使其失活。时间在30秒至3小时之间,最多4小时,更优选1分钟,5分钟,10分钟,30分钟,45分钟,1小时,1小时30分钟,或2小时,最多3小时,甚至4小时。该质壁分离步骤使得酵母变性,内源酶失活和膜通透,从而释放可溶部分。可溶部分主要包含游离氨基酸、小肽、矿物质,并且在这些氨基酸中,一些氨基酸有味道,例如谷氨酸。

[0025] 在本发明的第一个实施方式中,使源自质壁分离步骤并且包含可溶部分和不溶部分的整体经受一种或多种酶活性。该步骤的目的是在不破坏蛋白质的情况下溶解最大数量的不是蛋白质的成分。优选使用核糖核酸酶活性(EC 3.1.4.1)和葡聚糖酶活性(EC 3.2.1)。可以依次或同时实施酶活性。核糖核酸酶的活性会将RNA转化为5'核苷酸,并使5'核苷酸溶解,从而使其进入可溶部分。可以使用几种核糖核酸酶,例如内切核酸酶和外切核酸酶的混合物。任选地,可以使用脱氨酶将AMP转化为IMP,以恢复可溶部分的增味性质。一种或多种葡聚糖酶的作用将使胞壁多糖溶解为可溶性寡糖。根据所用酶的说明书的功能调整时间和温度。温度在40至65℃之间,优选60℃。时间为8至24小时,优选为16至24小时,更优选为18小时。该酶促步骤首先可以获得新的可溶部分,其包含核苷酸、多糖(约占总碳水化合物化合物的60%)和小比例的氨基酸,其次是基本上包含蛋白质的不溶部分。

[0026] 最后一步是分离可溶部分和不溶部分。

[0027] 在本发明的第二个实施方式中,将源自质壁分离步骤的可溶部分和不溶部分分离。将可溶部分搁置,除去并将其回收为酵母提取物。不溶部分包括壳(或壁)、聚合物、多糖、RNA和由于热凝结的蛋白质。保留该不溶部分。根据相似的温育方案(温度,时间),使其

经受如上所述的核糖核酸酶和葡聚糖酶的酶活性,并使可溶和不溶部分分离。将最终的可溶部分搁置并使用。

[0028] 来自酶消化的最终不溶部分的“真”蛋白质含量高于或等于70%,优选高于或等于72%,80%以及高至85%。通常,酵母包含50%到55%的“真”蛋白质。利用本发明的方法,可以去除许多元素并获得具有较高的蛋白质浓度的产物。任选地,可以通过溶剂(乙醇、己烷)的作用或通过超临界CO₂或通过脂肪酶或磷脂酶的作用来减少该不溶部分中脂质的量。然后可以达到高于80%的真蛋白质纯度。

[0029] 在本发明的一个实施方式中,以任何顺序依次实施核糖核酸酶和葡聚糖酶的各自作用。在本发明的一个优选的实施方式中,同时应用核糖核酸酶和葡聚糖酶活性。

[0030] 可以将获得的产物冷冻干燥,用本领域技术人员已知的方法(例如通过喷雾干燥或真空干燥)干燥,并在保证其品质和性质的同时进行储存。

[0031] 因此,在一个实施方式中,本发明涉及一种用于获得酵母蛋白质的方法,包括以下步骤:

[0032] a) 提供酵母膏;

[0033] b) 在70至95℃的温度下使该酵母膏暴露于热质壁分离1分钟至3小时,优选40分钟至2小时;

[0034] c) 在40至65℃的温度下依次或同时使整体经受至少一种核糖核酸酶和一种葡聚糖酶的活性8至24小时;

[0035] d) 使不溶部分和可溶部分分离,

[0036] 其中,在步骤d)收集的不溶部分是无味的,核苷酸含量小于3%,真蛋白质含量至少为72%。

[0037] 在另一个实施方式中,本发明涉及一种用于获得酵母蛋白质的方法,包括以下步骤:

[0038] a) 提供酵母膏;

[0039] b) 在70至95℃的温度下使该酵母膏暴露于热质壁分离1分钟至3小时,优选40分钟至2小时;

[0040] b') 使不溶部分和可溶部分分离;

[0041] c) 在40至65℃的温度下依次或同时使不溶部分经受至少一种核糖核酸酶和一种葡聚糖酶的活性8至24小时;

[0042] d) 使不溶部分和可溶部分分离,

[0043] 其中,在步骤d)中收集的不溶部分是无味的,核苷酸含量小于3%,真蛋白质含量至少为72%。

[0044] 在本说明书的其余部分中,在步骤d)中收集的不溶部分也可以称为“本发明的(酵母)蛋白质提取物”。相反,可以根据已知的现有技术方法从得自质壁分离的可溶部分中获得的酵母蛋白质提取物称为“常规蛋白质提取物”。

[0045] 在本发明的一个优选的实施方式中,步骤a)中的酵母膏源自酵母的发酵,所述酵母选自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母属(*Pichia*) (优选杰丁毕赤酵母(*Pichia jadinii*))、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) (优选马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)或乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*))、耶氏酵母属

(Yarrowia) (优选解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)), 或威克汉姆酵母属 (*Wickerhamomyces*) (优选异常威克汉姆酵母 (*Wickerhamomyces anomalus*))。有利地, 酵母选自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、杰丁毕赤酵母 (*Pichia jadinii*) 或马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)。优选的酵母是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。

[0046] 在本发明的一个优选的实施方式中, 热质壁分离步骤a) 在80至90℃之间的温度下进行。

[0047] 在本发明的一个优选的实施方式中, 同时应用葡聚糖酶和核糖核酸酶活性。

[0048] 任选地, 也可以应用脱氨酶活性。

[0049] 有利地, 步骤a) 中使用的酵母膏包含富硒酵母。可以按照技术人员已知的方法, 例如申请EP 1478732中描述的方法, 进行富硒酵母的培养。然后, 酵母培养物中的硒含量可以达到3000ppm或更高。

[0050] 在不溶部分中获得的产物中专门的蛋白质氮含量高于或等于11.5干物质%, 即72%的真蛋白质(使用上文给出的6.25的转化系数)。通常, 酵母的最大氮含量为11%, 这会产生69%的潜在蛋白质。酵母还含有非蛋白质氮物质(核酸、RNA、DNA)。从总氮中减去核酸氮时, 酵母仅包含50%到55%的蛋白质。因此, 在最终的不溶部分中获得的72%蛋白质的最小含量是本发明方法的特征。在该不溶部分中, 总核苷酸含量为0.8至1.5%, 以及最多3%, 总碳水化合物含量为1至8% (本领域技术人员已知的蒽酮测定法), 葡聚糖含量为0.2至4%, 甘露聚糖含量为0.2%至4%, 脂质含量为7%至15%, 矿物质含量为1%至7%。

[0051] 令人感兴趣的是本发明方法获得的酵母蛋白质提取物区别于现有技术提取物(即在细胞裂解和浓缩步骤后从可溶部分中获得的蛋白质提取物), 本发明方法获得的酵母蛋白质提取物中蛋白质含量至少为72%, 核苷酸含量低于3%。

[0052] 为此目的, 在酸水解并在索氏提取器上用己烷萃取后, 采用重量分析法测定源自酿酒酵母的蛋白质提取物中总脂质。脂质水平系统性地高于7%。因此, 在本发明的提取方法中在步骤d) 中收集的不溶部分的脂质含量也高于7%。相比之下, “常规”酵母蛋白质提取物中的脂质含量低于1%。脂质含量可根据酵母种类或菌株而不同。通常, 对于工业产品, 在技术数据表中标明起始微生物。本领域技术人员将能够外推并推断蛋白质提取物中的种类/脂质含量组合。

[0053] 对于经历了脱脂步骤的本发明的酵母蛋白质提取物, 脂质含量可能不足以区分两个来源。然后, 对蛋白质提取物的蛋白质溶解度曲线进行评估完成比较分析。溶解度百分比由以下公式确定:

$$[0054] \quad \% \text{ 溶解度} = \frac{\text{上清液中的总 N\%}}{\text{反应介质中的起始 N\%}}$$

[0055] 其中, N%表示根据凯氏定氮法测定的氮百分比。

[0056] 本发明的蛋白质提取物在水中的溶解度小于3.5%。

[0057] 相比之下, “常规”酵母蛋白质提取物被认为是可溶的, 仅包含5%至10%的不溶元素。

[0058] 为了相同的目的, 比较本发明的酵母蛋白质提取物和现有技术的蛋白质提取物之

间的分子量图谱。本发明获得的酵母蛋白质提取物没有表现出低分子量峰。大部分蛋白质图谱分布在40-45kDa左右。发现最小的化合物约为500Da,其对应于小肽。相比之下,“常规”酵母蛋白质的图谱显示出多个分子量峰,以及量不可忽略的低分子量。可以外推这些图谱并测量比率:

总氨基酸-游离氨基酸

[0059]

总氨基酸

[0060] (使用食品中氨基酸的常规测定方法,例如,委员会法规(EC) N° 152/2009的官方方法测定氨基酸)。对于本发明的酵母蛋白质提取物,该比率接近于1,总是高于0.9,而对于“常规”酵母蛋白质提取物,该比率可以在0.30至0.85之间。

[0061] 用本发明的方法获得的产物通过其微生物来源(换言之,非植物和非动物),其高蛋白质含量,低核酸含量以及仍存在细胞膜脂质(如果没有应用脱脂处理的话)而与已知的蛋白质提取物相区别。另外,它是无味的。其微生物来源还具有以下优点:其源自己知不会致敏的原料。

[0062] 酵母蛋白质的主要优势在于其营养品质。因此,用本发明的方法获得的产物作为蛋白质来源具有一个主要优点:由PDCAAS评分(蛋白质消化率校正的氨基酸评分)表示为1的品质,也就是说其品质与参考动物蛋白质(例如酪蛋白和卵清蛋白)近似。蛋白质品质的评估可以确定其满足代谢需求的能力。结果,与营养和食物或运动补充剂有关的任何应用都可以使用通过本发明的方法获得的蛋白质提取物。本文引用的应用并非旨在穷举。

[0063] 在人类营养、健康和福祉的范围内,所述蛋白质提取物可用于体重控制,其作为运动员或老年人的补充剂,作为食品补充剂或以高蛋白质棒或饮料的形式。例如,所述蛋白质提取物可被用作素食型饮食中的非动物性蛋白质来源,例如用于奶昔、汉堡、鸡块、植物性熟食肉、馄饨馅料、肉丸、燕麦片、意大利面调味料中。类似地,富含蛋白质的面包或面包制造产品可以使用通过本发明的方法获得的蛋白质提取物。如前所述,这些蛋白质提取物的优点是它们没有味道、苦味或异味,这些正是某些当今植物性或藻类蛋白质的特征。在人类健康中,所述蛋白质提取物可用于婴儿营养或临床营养,即口服或肠内营养以纠正营养失衡。有利地,当从富硒酵母膏中获得蛋白质提取物时,其可用作刺激免疫力和/或增强皮肤、头发和/或指甲质量的食物补充剂。

[0064] 最后,所述蛋白质提取物可被用作动物饲料中的蛋白质供应。有利地,当从富含硒的酵母膏中获得蛋白质提取物时,动物将受益于蛋白质和硒的联合供应,所述硒是可生物利用的,因为它以硒蛋氨酸的形式整合在蛋白质中。

[0065] 因此,本发明还涉及根据本发明方法的任何实施方式获得的,具有真蛋白质含量至少为72%的酵母蛋白质提取物作为用于老年人或运动员的体重控制的食物补充剂的用途,涉及所述蛋白质提取物用作饮料、面包制造产品或植物性熟食肉中的非动物性蛋白质来源的用途,涉及所述蛋白质提取物用于口服或肠内临床营养的用途,或所述蛋白质提取物用于动物营养的用途。换句话说,在一个实施方式中,本发明涉及一种用于人类营养和/或动物营养的食物补充方法,包括以下步骤:

[0066] -通过实施根据本发明的用于获得酵母蛋白质的方法的任何实施方式来获得酵母蛋白质提取物;以及

[0067] 分别将所述蛋白质提取物作为用于老年人或运动员的体重控制的食物补充剂施予人,和/或作为蛋白质摄入物施予动物。

[0068] 如前所述,本发明方法的最终可溶部分也可以被搁置并使用。它们中的碳水化合物总量很高,可以与甜汁相提并论。总碳水化合物含量在45%至70%之间。这些碳水化合物以葡聚糖(25%至40%)和甘露聚糖(25%至35%)的形式存在,从而使得该可溶部分用于免疫刺激,特别是用于动物健康。根据所用葡聚糖酶的类型,也可以释放游离葡萄糖。当AMP通过脱氨酶转化为IMP时,该可溶部分富含总核苷酸,更特别是5'-GMP和5'-IMP。因此,其可以用作增味剂。当AMP没有转化为IMP时,该产品可用于掩盖苦味或异味,如专利申请FR1762074中所述。其组合物还成为各种微生物,尤其是细菌的良好生长底物。

[0069] 下面的实施例可以说明本发明。它们不应被解释为限制本发明的范围。

[0070] 实施例

[0071] 实施例1:由酿酒酵母制备浓缩蛋白质提取物(>75%)

[0072] 在使得酵母高氮含量达到约10干物质%氮的条件下进行酿酒酵母发酵。对该发酵的浆使用离心分离,以获得以16-18干物质%的酵母的酵母膏,然后洗涤该膏。

[0073] 在实验室中,对3kg该富含氮的,洗涤后的膏进行热质壁分离:使用交换器使膏的温度达到70至95℃之间的温度,然后将该3kg膏在浸入热水浴中的烧杯中温育。搅动该膏并在烧杯中保持所述膏在该温度下2小时。然后将反应介质的温度降低至60℃。将一部分转移到500mL锥形瓶中。将该锥形瓶浸入温度调节至60℃的热水浴中。添加以下剂量的酶:0.2%(g/100g膏)的两种葡聚糖酶的混合物和0.1%内切核酸酶和外切核糖核酸酶的混合物。搅拌下温育18小时。温育后离心。搁置含有游离核苷酸、多糖和少量氨基酸的可溶部分。不溶部分是酵母蛋白质提取物。洗涤3次后,其组成如下:13.0%的氮、3%的总核苷酸和4.7%的总碳水化合物,即77%的真蛋白质。

[0074] 实施例2:根据方法1的变型由酿酒酵母制备浓缩蛋白质提取物(75%)。

[0075] 在实施例1中描述的方法的一个变型中,在热质壁分离后,通过离心将不溶部分与包含游离氨基酸的上清液分离。将不溶部分吸收到与所丢弃的上清液的体积相等的自来水中,然后再次离心。此操作总共进行3次。最终回收2kg 16干物质%的不溶部分,其包含蛋白质、多糖和核酸材料。将一部分转移至500mL锥形瓶中。将锥形瓶浸入温度调节至60℃的热水浴中,该方法的其余步骤同前面实施例中所述的方法。

[0076] 最终获得的蛋白质提取物的组成如下:12.2%的氮、1.4%的总核苷酸和2.9%的总碳水化合物,即75%的真蛋白质。

[0077] 实施例3:由酿酒酵母制备浓缩蛋白质提取物(>80%)

[0078] 按照实施例2中所述的方案,通过热质壁分离、离心分离和洗涤的步骤,制备酿酒酵母的包含蛋白质、多糖和核酸材料的不溶部分。

[0079] 将这一部分的干提取物调节至14%,并将pH调节至酶的最佳pH。将200g该部分在以下酶剂量的存在下,在浸入60℃热水浴的锥形瓶中搅拌下温育18小时:0.2%的葡聚糖酶纯化液体试剂和0.1%的内切核糖核酸酶和外切核糖核酸酶的混合物。离心收集不溶部分,洗涤3次。获得的蛋白质提取物包含13.6%的氮、2.4%的总核苷酸和4.2%的总碳水化合物,即83%的真蛋白质。

[0080] 实施例4:由酿酒酵母快速制备浓缩蛋白质提取物(75%)

[0081] 在实施例2中描述的方法的一种变型中,可将温育时间缩短至8小时。然后获得的蛋白质提取物包含12.5%的氮、3%的总核苷酸和4.4%的总碳水化合物,即75%的真蛋白质。

[0082] 实施例5:由酿酒酵母制备浓缩蛋白质提取物(80%)

[0083] 在实施例2中描述的方法的一种变型中,将蛋白质提取物干燥,然后用五倍体积的乙醇提取,洗涤,沥干并再次真空干燥。然后获得的蛋白质提取物包含13.3%的氮、2%的总核苷酸和3.1%的总碳水化合物,即81%的真蛋白质。

[0084] 实施例6:由杰丁毕赤酵母制备浓缩蛋白质提取物

[0085] 在使得获得的酵母的氮含量为9干物质%的条件下进行杰丁毕赤酵母的发酵。对该发酵浆进行离心分离,以获得11-13干物质%的酵母膏,并洗涤该膏。

[0086] 在实验室中,按照与酿酒酵母菌株相同的操作规程,对3kg的这种富含氮的膏在70至95℃的温度下进行热质壁分离2小时。离心收集不溶部分,并洗涤3次。

[0087] 将这部分的干提取物调节至11-13%,并将pH调节至酶的最佳pH。将200g该部分在以下酶剂量存在下,在浸入60℃热水浴中的锥形瓶中搅拌下温育18小时:0.2%的葡聚糖酶纯化液体试剂和0.1%的内切核糖核酸酶和外切核糖核酸酶的混合物。离心收集不溶部分,并洗涤3次。然后获得的蛋白质提取物包含11.7%的氮、1.4%的总核苷酸和13.3%的总碳水化合物,即72%的真蛋白质。

[0088] 实施例7:由马克斯克鲁维酵母制备浓缩蛋白质提取物。

[0089] 在使酵母的氮含量达到8干物质%的条件下进行马克斯克鲁维酵母的发酵。对该发酵浆施加离心分离以获得酵母膏并洗涤所述膏。按照前述方案应用热质壁分离,离心,洗涤不溶部分,并用含有葡聚糖酶和内切核糖核酸酶和外切核糖核酸酶的酶混合物温育。再离心一次并洗涤含有蛋白质的不溶部分。

[0090] 获得的蛋白质提取物包含11.8%的氮、1.3%的总核苷酸和8.8%的总碳水化合物,即72%的真蛋白质。

[0091] 实施例8:测定用本发明的方法获得的“不溶”蛋白质提取物中的总脂质,并将其与根据现有技术从细胞裂解后从酵母的可溶部分提取的“常规”酵母蛋白质提取物的脂质含量进行比较。

[0092] 所用方法是在酸水解并在索氏提取器上用己烷萃取后的重量分析法。EC法规152/2009号中介绍了此方法。在下表1中给出结果。从根据本发明获得的三批蛋白质提取物中,这些结果表明每100g提取物中脂质含量接近10-11g。相比之下,从裂解酵母的可溶部分获得的现有技术的酵母蛋白质提取物的脂质含量显示为每100g提取物小于1g。

[0093]	本发明的蛋白质提取物 (来自不溶部分)			现有技术的蛋白质 提取物 (来自可溶 部分)
	批次 1	批次 2	批次 3	
总脂质 (g/100g)	11.2	10.8	11.1	<1

[0094] 实施例9:蛋白质溶解度曲线的测定

[0095] 对由根据本发明的蛋白质提取物的批次1(参见实施例8)得到的样品,在水溶液中三个不同pH值下并且使用2%(w/v)的最终蛋白质浓度来测定蛋白质溶解度曲线。在环境温度搅拌下60分钟的溶解时间后,通过离心收集上清液,并根据标准NF EN ISO 5983-2用凯氏定氮法测定上清液中的总氮含量。对于每个pH值,通过以下公式确定溶解度百分比:

$$[0096] \quad \% \text{ 溶解度} = \frac{\text{上清液中的总 N\%}}{\text{反应介质中的起始 N\%}}$$

[0097] 所得结果低于3.5%。

[0098] 实施例10:测定本发明的蛋白质提取物和“常规”蛋白质提取物的各自的分子量图谱。

[0099] 如上所述,“本发明的蛋白质提取物”表示从裂解的酵母细胞的不溶部分获得的酵母蛋白质提取物。相反,“常规酵母蛋白质提取物”表示通过从裂解酵母细胞的可溶部分提取而获得的酵母蛋白质。用本领域技术人员已知的方法进行提取。

[0100] 如实施例9所示,本发明的蛋白质提取物不溶于水性条件。已经开发了通过尺寸排阻色谱法进行溶解和分析的特定条件。规程如下(图2中的方法SEC1):

[0101] -在5mL流动相中溶解10mg样品(在90℃下搅拌48小时),

[0102] -在40℃下分析在Agilent®PL凝胶柱,20μm MIXED-A(2000至40 000 000g/mol, PS当量)上获得的溶液。

[0103] 流动相:DMSO/LiCl 0.25M。

[0104] RI(折射率)和紫外线(280nm)检测器。

[0105] 用于“常规”酵母蛋白质提取物的方法(图2中的方法SEC2)摘自OIV专著(国际葡萄与葡萄酒组织):

[0106] -在水中溶解样品;

[0107] -在SUPERDEX 200 10/300 GL色谱柱(10000至600 000Da,球状蛋白质当量;1000至100 000g/mol,葡聚糖当量)上分析。

[0108] 流动相:磷酸盐缓冲液+0.25M NaCl,pH 7.2

[0109] 在214、260和280nm处UV检测。

[0110] 在图2中给出各自的蛋白质图谱。

[0111] 本发明的酵母的蛋白质提取物图谱分布在约45kDa,并且不表现出低分子量的峰(范围2-10kDa)。相比之下,“常规”酵母的蛋白质提取物图谱存在显著差异:其在2-10kDa的低分子量范围内显示出两个不同的峰,总体上,图谱中的峰更加不同且更广泛。

[0112] 按照EU EC 152/2009号法规中给出的官方方法的总氨基酸和游离氨基酸的测定法还可以确定比率:

$$[0113] \quad \frac{\text{总氨基酸} - \text{游离氨基酸}}{\text{总氨基酸}}$$

[0114] 对于本发明的酵母蛋白质提取物(对于实施例8中测定脂质的3批次测定),该比率非常接近1(或100%),并且总是高于0.9(或90%)。对于本申请人的“常规”酵母蛋白质提取物和可商购的提取物,通常为0.30至0.85(30%至85%)。

[0115] 实施例11:由富硒酿酒酵母的培养物制备浓缩蛋白质提取物(>75%)。

[0116] 对一批富硒酵母膏进行实施例1或实施例2中所述的蛋白质提取方法。该酵母膏中的硒含量接近3200ppm。

[0117] 获得的蛋白质提取物中的总氮含量为13.5%，真蛋白质含量为76.7%。总硒含量为4 750ppm(mg Se/kg,干重)。硒蛋氨酸含量为84%(当量Se/Se tot)。相比之下，硒化酵母 **SelSaf®3000** (可生物利用的有机硒源)的硒蛋氨酸含量为63%。

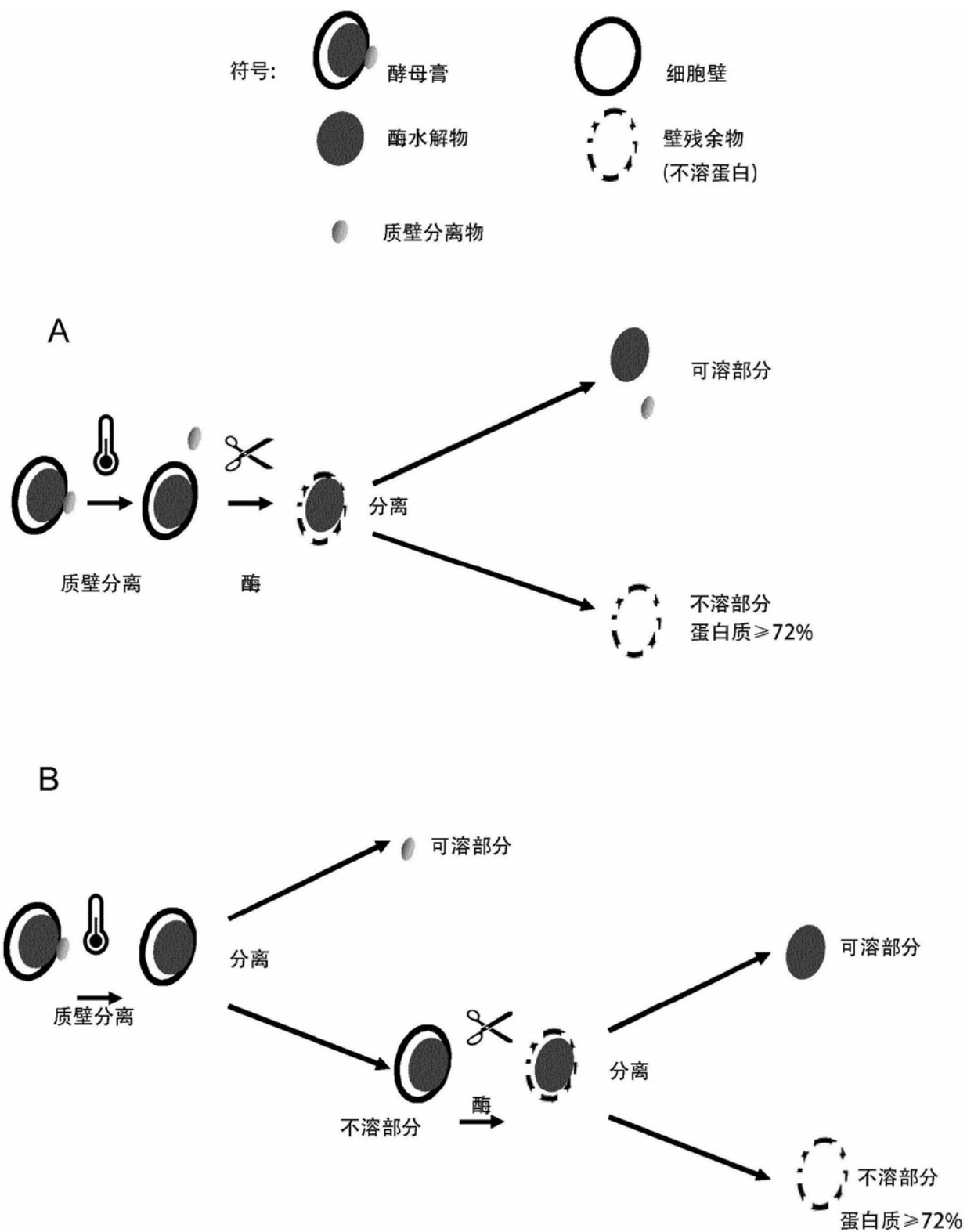


图1

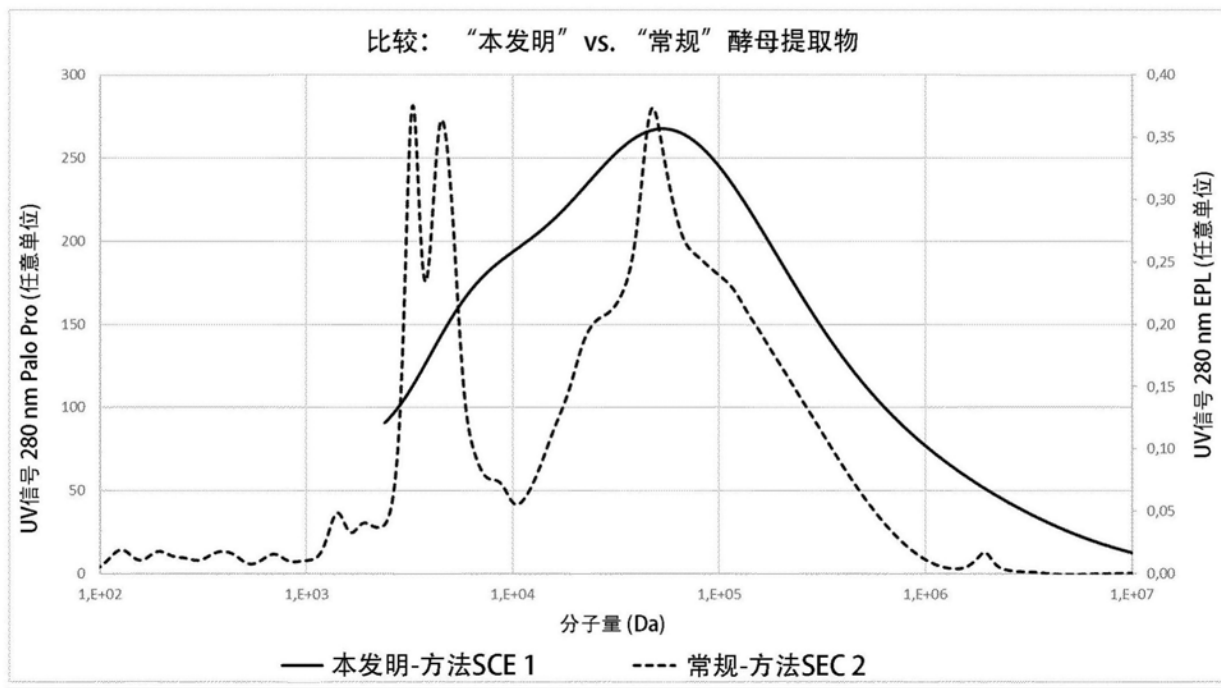


图2