



(10) 授权公告号 CN 114072004 B

(45) 授权公告日 2024.08.27

(21) 申请号 202080038127.6

(22) 申请日 2020.05.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114072004 A

(43) 申请公布日 2022.02.18

(30) 优先权数据
2023197 2019.05.24 NL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.23

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/NL2020/050336 2020.05.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/242302 EN 2020.12.03

(73) 专利权人 艾维贝皇家合作公司
地址 荷兰芬丹

(72) 发明人 大卫·伊格纳西奥·哈比奇·纳尔
瓦兹
力博·弗克斯·贾尔马

罗宾·埃里克·雅各布斯·斯贝尔
布灵克

马克·克里斯蒂安·劳斯

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有
限公司 11270

专利代理师 王子晔 李维凤

(51) Int.Cl.
A23J 1/00 (2006.01)
A23J 3/14 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 108882725 A, 2018.11.23
CN 109068681 A, 2018.12.21
WO 03003836 A1, 2003.01.16
Deok Han Kim 等. "Modeling of power
generation with thermolytic reverse
electrodialysis for low-grade waste heat
recovery". 《APPLIED ENERGY》. 2016, 第189卷
Figure 2.

审查员 徐烜

权利要求书3页 说明书22页 附图4页

(54) 发明名称

渗滤

(57) 摘要

本发明提供了使用块茎加工水的预处理和针对盐溶液的渗滤来分离天然块茎蛋白质的方法。这个步骤顺序具有蛋白质在渗滤过程中得到稳定,增加的工艺效率以及蛋白质质量和产率的优点。

1. 一种用于分离天然块茎蛋白质分离物的方法,其包括:
 - a) 加工至少一个块茎,以获得包含天然块茎蛋白质的块茎加工水;
 - b) 对所述块茎加工水进行包括一个或更多个以下步骤的预处理:
 - ba) 浓缩;和/或
 - bb) 稀释;和/或
 - bc) pH调整;和/或
 - bd) 絮凝;和/或
 - be) 固体去除;和/或
 - bf) 热处理;所述预处理产生包含天然块茎蛋白质、电导率为 $2-20\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的经预处理的块茎加工水;
 - c) 使用 $3-500\text{kDa}$ 的膜,进行经预处理的块茎加工水针对电导率为至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的盐溶液的渗滤步骤;
从而获得作为渗滤保留物的所述天然块茎蛋白质分离物,
其中,所述天然块茎蛋白质分离物是包含天然蛋白酶抑制剂和天然patatin的天然块茎蛋白质分离物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述天然块茎蛋白质分离物是定义为包含天然形式的所有块茎蛋白质的分离物的总天然块茎蛋白质分离物。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述方法进一步包括配糖生物碱去除步骤,以获得包含至多 $200\text{mg}/\text{kg}$ 配糖生物碱的块茎蛋白质分离物。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述配糖生物碱去除步骤作为步骤b的部分或在步骤c后执行。
5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中获得块茎加工水的所述加工包括块茎的制浆、捣碎、铨磨、研磨、压制或切割,以及任选地与水的组合。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述加工进一步包括淀粉去除步骤。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述加工进一步包括通过倾析、离心、旋流或过滤的淀粉去除步骤。
8. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述至少一个块茎在加工之前去皮。
9. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述固体去除包括过滤、离心、旋流、倾析和/或微滤的步骤。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述固体去除包括微滤步骤。
11. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述预处理包括选自超滤、反渗透和/或冷冻浓缩的浓缩步骤。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述浓缩步骤为超滤步骤。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述超滤步骤使用 $5-300\text{kDa}$ 的膜来执行。
14. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述超滤步骤使用 $30-200\text{kDa}$ 的膜来执行。
15. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述超滤步骤使用 $40-120\text{kDa}$ 的膜来执行。
16. 根据权利要求12所述的方法,其中,所述超滤步骤使用 $50-100\text{kDa}$ 的膜来执行。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述渗滤步骤之前是超滤步骤。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中,所述超滤步骤使用5-300kDa的膜来执行。
19. 根据权利要求17所述的方法,其中,所述超滤步骤使用30-200kDa的膜来执行。
20. 根据权利要求17所述的方法,其中,所述超滤步骤使用40-120kDa的膜来执行。
21. 根据权利要求17所述的方法,其中,所述超滤步骤使用50-100kDa的膜来执行。
22. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述预处理包括任何次序的超滤步骤和微滤步骤。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述超滤步骤使用5-300kDa的膜来执行。
24. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述超滤步骤使用30-200kDa的膜来执行。
25. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述超滤步骤使用40-120kDa的膜来执行。
26. 根据权利要求22所述的方法,其中,所述超滤步骤使用50-100kDa的膜来执行。
27. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,渗滤使用截留分子量为5-300kDa的膜来执行。
28. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,渗滤使用截留分子量为5-50kDa或50-200kDa的膜来执行。
29. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述渗滤针对包含氯化物的盐溶液来执行。
30. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述渗滤针对包含NaCl、KCl或CaCl₂的盐溶液来执行。
31. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述盐溶液的电导率为5-20mS · cm⁻¹。
32. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述盐溶液的电导率为5-18mS · cm⁻¹。
33. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述盐溶液的电导率为8-14mS · cm⁻¹。
34. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述盐溶液的电导率为9-11mS · cm⁻¹。
35. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,渗滤期间的pH低于4.0,或高于5.5。
36. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,渗滤期间的pH高于6.0。
37. 根据权利要求1所述的方法,其中,对所述渗滤保留物进行超滤步骤,以获得浓缩的块茎蛋白质分离物。
38. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述超滤步骤使用5-300kDa的膜来执行。
39. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述超滤步骤使用30-200kDa的膜来执行。
40. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述超滤步骤使用40-120kDa的膜来执行。
41. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述超滤步骤使用50-100kDa的膜来执行。
42. 根据权利要求12至26和37至41中任一项所述的方法,其中,渗滤或超滤中的第一个提供包含块茎游离氨基酸的透过物。
43. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述透过物随后进行干燥,以产生块茎游离氨基酸组合物。
44. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述透过物随后通过喷雾干燥和/或冷冻干燥进行干燥,以产生块茎游离氨基酸组合物。
45. 根据权利要求43或44所述的方法,其中,在干燥之前,通过超滤、反渗透和/或冷冻浓缩来浓缩所述透过物。
46. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,将所述块茎蛋白质分离物的pH调整到高于2.5。

47. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,将所述块茎蛋白质分离物的pH调整到高于2.75。

48. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,将所述块茎蛋白质分离物的pH调整到小于3.5。

49. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,将所述块茎蛋白质分离物的pH调整到小于3.0。

50. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述块茎蛋白质分离物随后进行干燥,以获得天然块茎蛋白质粉末。

51. 根据权利要求50所述的方法,其中,在干燥之前,对所述块茎蛋白质分离物进行进一步浓缩步骤。

52. 根据权利要求50所述的方法,其中,在干燥之前,对所述块茎蛋白质分离物进行通过反渗透、蒸发或冷冻浓缩的进一步浓缩步骤。

53. 根据权利要求50所述的方法,其中,在干燥之前,将所述块茎蛋白质分离物的pH调整到5.5-7.0。

54. 根据权利要求50所述的方法,其中,在干燥之前,将所述块茎蛋白质分离物的pH调整到6.0-7.0。

55. 根据权利要求50所述的方法,其中,所述干燥通过冷冻干燥或喷雾来执行。

56. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述渗滤保留物包含作为干物质百分比的至少75重量%的天然块茎蛋白质,至多1.0重量%的葡萄糖、果糖和蔗糖总量,至多1重量%的块茎游离氨基酸,至多10mg/kg的亚硫酸盐,至多200mg/kg的配糖生物碱,和/或至多5mg/kg选自镉、汞、铅和砷组成的组的重金属。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中,所述渗滤保留物包含至多5mg/kg的亚硫酸盐。

58. 根据权利要求56所述的方法,其中,所述渗滤保留物包含至多100mg/kg的配糖生物碱。

59. 根据权利要求56所述的方法,其中,所述渗滤保留物包含至多50mg/kg的配糖生物碱。

60. 根据权利要求56所述的方法,其中,所述渗滤保留物包含至多25mg/kg的配糖生物碱。

61. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,操作所述方法,以产生每小时至少5kg蛋白质。

62. 根据权利要求1或2所述的方法,其中,操作所述方法,以产生每小时至少25kg蛋白质。

渗滤

背景技术

[0001] 尤其是由于伴随肉类来源的食物产品的环境负担的意识增加,存在对于传统食物产品的素食和纯素食类似物的增加需求。然而,基于植物的蛋白质在各个方面仍无法与动物衍生的产品竞争。一个原因是在制备成食物产品之前,基于植物的蛋白质经常必须进行分离且加工。

[0002] 马铃薯蛋白质是可广泛获得的,因为马铃薯在大规模上进行加工,以获得淀粉以及各种马铃薯产品。马铃薯蛋白质具有使其对于在人食物应用中的使用理想的氨基酸组成。然而,足够质量的可溶性马铃薯蛋白质的分离是繁琐的过程。

[0003] 马铃薯蛋白质照常规从淀粉生产侧流中进行分离,所述淀粉生产侧流通过将整个马铃薯研磨或捣碎并随后分离淀粉进行制备。所得到的流出物包含马铃薯蛋白质,其可以通过各种方法进行分离,以获得天然蛋白质或凝固蛋白质。凝固蛋白质可以通过常规方法获得,但具有缺乏功能性和溶解度的缺点。因此,天然蛋白质在许多食品应用中是更期望的。

[0004] 然而,分离的天然马铃薯蛋白质经常遭受异味和颜色过多的缺点,这使得在食物产品中的应用变得困难。使用吸附或色谱法例如膨胀床吸附、膜吸附或离子交换色谱法获得最佳结果,但这些过程是昂贵且费力的,特别是在工业规模上,因为它们需要一系列预处理,并且必须在高浓度下操作以达到可接受的效率。

[0005] 分离天然蛋白质的其它方法也已得到应用。各种膜工艺如超滤和渗滤已应用于不同设置中。然而,(仅)使用此类方法分离具有足够质量的蛋白质仍是挑战,因为蛋白质经常不是足够纯的。另外,膜工艺遭受膜堵塞的缺点,这妨碍了在大规模下的应用。在渗滤过程中,蛋白质趋于聚集和沉淀,这妨碍了渗滤在可行的商业工艺中的应用。

[0006] 从马铃薯侧流中分离蛋白质的更通用方法将增加马铃薯蛋白质的可得性,并且因此允许对功能上理想的基于植物的蛋白质的增加可得性,从而增加食物供应的可持续性。本发明提供了基于渗滤的用于天然马铃薯蛋白质分离的优化方法,其可以在大规模下实施。

附图说明

[0007] 图1:马铃薯蛋白质在各种pH和电导率下的溶解度。

[0008] 图2:当暴露于机械应力时,马铃薯蛋白质在pH 6和7下在不同电导率下的溶解度。

[0009] 图3:在实施例6的第一次渗滤和第二次渗滤期间的通量-浓度图。

[0010] 图4:马铃薯总分离物在各种电导率下的溶解度。

[0011] 图5:马铃薯总分离物在各种电导率下的溶解度。

[0012] 图6:总蛋白质分离物包含也存在于块茎中的所有蛋白质级分(MF-PFJ)。L蛋白质标准,泳道1:实施例4实验9MF-PFJ,泳道2:实施例4实验10MF-PFJ,泳道3:实施例4实验11MF-PFJ,泳道4:实施例5MF-PFJ,泳道5:实施例5最终产物(DF保留物),泳道6:实施例4实验9最终产物(干燥的),泳道7:实施例4实验10最终产物(干燥的),泳道8:实施例4实验11最

终产物(干燥的)。

具体实施方式

[0013] 本发明涉及一种用于分离天然块茎蛋白质分离物的方法,其包括:

[0014] a) 加工至少一个块茎,以获得包含天然块茎蛋白质的块茎加工水;

[0015] b) 对所述块茎加工水进行包括一个或更多个以下步骤的预处理:

[0016] ba) 浓缩;和/或

[0017] bb) 稀释;和/或

[0018] bc) pH调整;和/或

[0019] bd) 絮凝;和/或

[0020] be) 热处理;和/或

[0021] bf) 固体去除;

[0022] 所述预处理产生包含天然块茎蛋白质、电导率为 $2-20\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的经预处理的块茎加工水;

[0023] c) 使用 $5-300\text{kDa}$ 的膜,进行经预处理的块茎加工水针对电导率为至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的盐溶液的渗滤步骤。

[0024] 从而获得作为渗滤保留物的所述块茎蛋白质分离物。

[0025] 本方法的优点在于可以从各种工艺流中大规模地分离天然块茎蛋白质。这可以伴随高效率、低蛋白质损失、低环境负担、低成本和相对较少的废物流来实现,以产生具有高溶解度、高纯度和完整功能性质的蛋白质。

[0026] 方法

[0027] 本方法涉及天然块茎蛋白质的分离。此上下文中的块茎包括也可以被称为根的结构。块茎固有地包含蛋白质;优选的块茎类型也富含淀粉,例如用于淀粉分离的块茎类型。

[0028] 优选地,此上下文中的块茎包括马铃薯(*Solanum tuberosum*)、甘薯(*Ipomoea batatas*)、木薯(*Manihot esculenta*、同义词*M.utilissima*,也称为*manioc*、*mandiocayuca*,并且还包括*M.palmata*,同义词*M.dulcis*,也称为*yuca dulce*)、山药(*Dioscorea spp*)和/或芋头(*Colocasia esculenta*)。更优选地,块茎包含马铃薯、甘薯、木薯或山药,甚至更优选地块茎包含马铃薯、甘薯或木薯,甚至更优选地块茎包含马铃薯或甘薯,并且最优选地块茎包含马铃薯(*Solanum tuberosum*)。

[0029] 优选的块茎蛋白质包含马铃薯蛋白质、甘薯蛋白质、木薯蛋白质、山药蛋白质和/或芋头蛋白质。马铃薯蛋白质是优选的。马铃薯是来自植物马铃薯(*Solanum tuberosum*)的块茎,其存在许多品种。本文的蛋白质分离方法可以用任何马铃薯品种执行。这包括预期用于淀粉工业的品种(淀粉马铃薯),以及用于人消费的品种(消费马铃薯)。

[0030] 所有块茎品种都包含天然块茎蛋白质。例如,天然马铃薯蛋白质可以分为三类(i) *patatin*家族,高度同源的酸性 43kDa 糖蛋白(40-50重量%的马铃薯蛋白质),(ii) 碱性 $5-25\text{kDa}$ 蛋白酶抑制剂(30-40重量%的马铃薯蛋白质)和(iii) 其它蛋白质,主要是高分子量蛋白质(10-20重量%的马铃薯蛋白质)。

[0031] 如本文定义的,蛋白酶抑制剂是根或块茎蛋白质,优选马铃薯蛋白质,其以天然形式能够抑制蛋白酶的蛋白酶活性。根或块茎蛋白质被视为蛋白酶抑制剂是普遍的一般知

识。在本上下文中,蛋白酶抑制剂指根或块茎蛋白质级分,其中至少80重量%,优选至少85重量%,更优选至少90重量%的所有蛋白质具有至多35kDa的分子量,如通过SDS-page确定的。

[0032] 如本文定义的,patatin是根或块茎蛋白质,优选马铃薯蛋白质,其是在块茎中充当贮藏蛋白质的酸性糖蛋白。在根和块茎加工工业中,一般已知根或块茎蛋白质中的哪一种被视为patatin。在本上下文中,patatin指根或块茎蛋白质级分,其中至少80重量%,优选至少85重量%,更优选至少90重量%的所有蛋白质具有多于35kDa的分子量,如通过SDS-page确定的。

[0033] SDS-page(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)是用于确定蛋白质的分子量的一般已知的技术。

[0034] 本方法涉及获得任何天然块茎蛋白质分离物。在一个实施方案中,天然块茎蛋白质分离物是天然蛋白酶抑制剂分离物。在另一个实施方案中,天然块茎蛋白质分离物是天然patatin分离物。在这些实施方案中,块茎加工水可以在渗滤步骤之前进行一种特定马铃薯蛋白质去除步骤。这可以通过吸附色谱法、选择性沉淀或已知将一种蛋白质级分与另一种蛋白质级分分开的任何其它方法来实现。在此类加工过程中保留在溶液中的蛋白质级分随后可以进行如本文定义的渗滤步骤。

[0035] 在更优选的实施方案中,块茎蛋白质分离物是包含天然蛋白酶抑制剂和天然patatin的分离物。在进一步更优选的实施方案中,块茎蛋白质分离物是总天然块茎蛋白质分离物。

[0036] 如本文使用的,总分离物指包含蛋白酶抑制剂和patatin、以及存在于所讨论的块茎中的任何其它蛋白质的蛋白质分离物。因此,总天然块茎蛋白质分离物可以定义为包含天然形式的所有块茎蛋白质的分离物。

[0037] 用本方法获得的蛋白质分离物是天然蛋白质分离物。在本上下文中的天然的意指来自块茎的蛋白质分离无需显著影响蛋白质而实现。因此,天然蛋白质并非显著降解的,也并非显著变性的。即,与块茎中存在的蛋白质相比,氨基酸次序、三维结构和功能性质(例如溶解度和/或乳化性质)是基本完整的。

[0038] 蛋白质的天然程度可以通过增溶实验进行测试。与天然蛋白质相比,非天然蛋白质在水中明显更不可溶。蛋白质溶解度可以通过以下进行确定:将蛋白质分散在水中,将所得到的液体分成两个级分,并且使一个级分暴露于以800g共5分钟的离心,以产生未溶解材料的团块,并且回收上清液。通过测量上清液和未处理溶液中的蛋白质含量,并且将上清液的蛋白质含量表示为未处理溶液中的蛋白质含量的百分比,来确定溶解度。确定蛋白质含量的方便方法是经由Sprint Rapid Protein Analyser(CEM),通过测量在280nm处的吸光度。在本上下文中,如果蛋白质的溶解度为至少55%,优选至少65%,更优选至少75%,甚至更优选至少85%或甚至至少90%,更优选至少90%,甚至更优选至少95%,最优选至少98%,则蛋白质被视为天然的。

[0039] 在本上下文中,分离意指获得作为(干净(clean))溶液或蛋白质粉末的蛋白质。可以通过使溶液干燥,从溶液获得粉末。任选地,干燥之前是例如通过反渗透、超滤或冷冻浓缩的浓缩步骤。在本上下文中的分离意指块茎蛋白质以溶解形式维持,直到使块茎蛋白质分离物干燥,以获得天然块茎蛋白质粉末。因此,分离优选不包括例如用海藻酸盐的蛋白质

沉淀步骤,得到沉淀的蛋白质级分,以及例如通过在分离后在水性溶剂中溶解沉淀的蛋白质级分,沉淀蛋白质的再溶解的后续步骤,以得到天然块茎蛋白质。蛋白质沉淀和随后的再溶解可能导致轻微变性,并且因此沉淀且再溶解的蛋白质不是根据本发明的蛋白质分离物。

[0040] 本发明公开了通过针对具有至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电导率的盐溶液的渗滤(DF),可以获得天然块茎蛋白质分离物。渗滤是使用特征在于截留分子量值(MWCO)的渗滤膜,通过稀释保留物同时去除滤液,用于去除低分子量化合物的过程。 10kDa 的MWCO值意指膜可以保留来自进料溶液的90%的分子量为 10kDa 的分子。天然块茎蛋白质分离物作为渗滤保留物获得。使用渗滤,预处理的块茎加工水中存在的盐可以被去除,但替换为盐溶液中的盐。

[0041] 在本上下文,渗滤膜(DF膜)是在渗滤过程中使用的膜。优选地,DF膜具有 $3-500\text{kDa}$,优选 $5-300\text{kDa}$,更优选 $5-200\text{kDa}$,例如优选 $30-200\text{kDa}$,更优选 $40-120\text{kDa}$,甚至更优选 $50-100\text{kDa}$ 的MWCO。在一个实施方案中,MWCO可以为 $3-50\text{kDa}$,优选 $5-25\text{kDa}$,例如 $5-15\text{kDa}$ 或 $15-25\text{kDa}$ 。在另一个实施方案中,MWCO可以为 $50-200\text{kDa}$,优选 $50-150\text{kDa}$ 。

[0042] 优选的DF膜是聚砜(PS)、聚醚砜(PES)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚丙烯腈(PAN)、再生纤维素和聚丙烯(PP)膜,优选PES或PS膜。优选的DF膜是各向异性DF膜。DF膜可以实现为管式、螺旋缠绕、中空纤维、板式和框架,或者交叉旋转诱导剪切改变单元。更优选的DF膜是管式DF膜。这些膜各自可以具有如上定义的MWCO。

[0043] 在优选实施方案中,渗滤作为连续(错流)过程执行。操作通量可以为例如 3 至 $3001 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间,优选 5 至 $2001 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间,更优选 5 至 $1001 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$,更优选 $6-701 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$,更优选 6 至 $301 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间,更优选 7 至 $301 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间,更优选 9 至 $201 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间。

[0044] 已发现块茎蛋白质且特别是马铃薯蛋白质中的主要蛋白质级分,在许多pH值下是带相反电荷的。patatin具有 $4.8-5.2$ 的pI,而蛋白酶抑制剂具有 5.8 直至 9 的pI。即使对于溶解度优化的pH值也不能防止聚集、沉淀和堵塞,特别是在渗滤过程中。已发现溶液的电导率对蛋白质溶解度具有很大影响,并且低溶解度可以通过增加电导率来抵消。这在渗滤过程中是特别重要的。

[0045] 已发现对于包含如本文定义天然蛋白质分离物的任何溶液,在整个分离过程中,电导率相对高是必要的。渗滤针对其执行的盐溶液必须具有至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电导率,且进料溶液必须具有 $2-20\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电导率。

[0046] 在渗滤过程中,蛋白质在膜的附近经历高机械应力。在渗滤过程中的流动模式迫使各种蛋白质分子聚集在一起,其导致被迫聚集和沉淀。此外,蛋白质可能与膜相互作用。在渗滤过程中由蛋白质经历的机械应力和任何膜相互作用因此导致并增加膜堵塞,其阻碍蛋白质溶液的工业渗滤。

[0047] 已发现具有至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电导率的盐溶液在伴随渗滤的机械应力期间稳定蛋白质,从而在机械应力下维持且甚至增加蛋白质溶解度。这增加了通量稳定性,增加了DF操作时间,并且还使蛋白质损失降到最低。因此,必须针对盐溶液来执行渗滤。这对于在渗滤过程中维持溶液中的蛋白质稳定性是重要的。如本文使用的,术语“盐溶液”定义为包含盐的溶液,所述溶液具有至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电导率。

[0048] 已发现盐溶液的电导率必须为至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$,优选至少 $8\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$,更优选至少

15mS · cm⁻¹,以便保持在渗滤过程中的所有块茎蛋白质的良好溶解度。然而,为了避免在渗滤过程中的过量盐添加,电导率优选小于100mS · cm⁻¹,更优选小于50mS · cm⁻¹,更优选小于20mS · cm⁻¹,甚至更优选小于18mS · cm⁻¹。

[0049] 此外必须的是待渗滤溶液(渗滤进料溶液或进料)的电导率为2-20mS · cm⁻¹,优选5-18mS · cm⁻¹,更优选8-14mS · cm⁻¹。这确保了蛋白质在渗滤之前不沉淀。所渗滤的进料溶液的pH优选低于4.0或高于5.5,更优选5.5-12,甚至更优选5.5-7.0。

[0050] 在进一步优选的实施方案中,渗滤针对具有如上定义的电导率的盐溶液执行,所述电导率优选为5-20mS · cm⁻¹,优选为5-18mS · cm⁻¹,更优选为8-15mS · cm⁻¹,甚至更优选为9-14mS · cm⁻¹,例如9-11或10-13mS · cm⁻¹。

[0051] 盐溶液优选包含氯化物盐,例如NaCl、KCl和/或CaCl₂,优选NaCl或KCl。盐溶液可以优选包含KCl。可替代地,盐溶液可以优选包含NaCl。进一步可替代地,盐溶液包含NaCl和KCl的混合物。

[0052] 优选地,盐是NaCl。在NaCl的情况下,盐溶液中的盐浓度可以为0.1-5重量%,优选0.2-2重量%。

[0053] 基于普遍的一般知识,技术人员可以在其它溶质的存在或不存在下,将所需的电导率转换为基于重量的浓度(或摩尔浓度)。例如,0.33重量%NaCl溶液的电导率为5.3mS/cm。

[0054] 在更优选的实施方案中,盐溶液不包含重金属盐,例如镉、汞、铅或砷盐。在进一步优选的实施方案中,盐溶液另外包含增加通量的NH₄HCO₃。

[0055] 在进一步优选的实施方案中,盐溶液可以具有低于4.0或高于5.5,更优选5.5-12,更优选5.5-8.0,甚至更优选6.0-8.0,例如5.5-7.0或6.0-7.0的pH。在优选实施方案中,该pH在渗滤过程自始至终维持。在其它优选的实施方案中,用于晚期渗滤阶段的盐溶液具有较高的pH,例如pH 8.0-12.0,优选9.0-11.0,以便进一步增加膜通量。

[0056] 渗滤优选以5:1至1:10,优选1:1至1:10(进料:盐溶液),优选在1:1至1:5的范围内,更优选1:1至1:4的稀释率执行。DF保留物可以进行第二DF阶段、第三DF阶段或甚至进一步的DF阶段。

[0057] 这些条件产生包含干净天然块茎蛋白质的渗滤保留物。渗滤保留物包含作为干物质百分比的至少75重量%,优选至少80重量%,更优选至少85重量%,甚至更优选至少90重量%的天然块茎蛋白质,优选至多1.0重量%,更优选至多0.5重量%,更优选至多0.1重量%的葡萄糖、果糖和蔗糖总量,优选至多1.0重量%的块茎游离氨基酸,更优选至多0.5重量%,更优选至多0.1重量%的块茎游离氨基酸,优选至多10mg/kg,更优选至多5mg/kg的亚硫酸盐,优选至多200mg/kg,更优选至多100mg/kg,更优选至多50mg/kg,甚至更优选至多25mg/kg的配糖生物碱,优选至多5mg/kg选自镉、汞、铅和砷组成的组的重金属,和/或优选至多10重量%,更优选至多5重量%的氯化物盐。优选地,灰分含量小于5重量%,更优选小于3重量%,更优选小于1重量%。进一步优选地,钾含量小于4重量%,优选小于2重量%,更优选小于1重量%。在更优选的实施方案中,渗滤保留物符合以组合的所有这些参数范围。所有数量已表示为干物质的百分比。

[0058] 在优选实施方案中,在所有渗滤阶段自始至终针对盐溶液来执行渗滤。在进一步优选的实施方案中,特别是在其中盐溶液以在本文指定范围内的相对高电导率应用的情况

下,针对盐溶液的渗滤可以随后为针对以较低电导率的水或普通水的渗滤阶段,以便去除盐并分离基本不含盐的天然块茎蛋白质。

[0059] 优选地,待渗滤溶液(渗滤进料溶液或进料)的电导率保持在本文指定的范围内。优选地,在该实施方案中,pH在所有渗滤阶段自始至终保持相同。因此,膜的堵塞可以针对渗滤后去除盐的需要进行平衡。以这种方式,可以获得相对于干物质具有低盐含量的块茎蛋白质分离物。

[0060] 可替代地,渗滤保留物可以任选地进行超滤(UF)步骤。这产生渗滤保留物的浓缩,同时去除在DF步骤期间添加的至少部分盐。优选地,电导率在UF期间或多或少保持恒定。以这种方式,获得浓缩的块茎蛋白质分离物,其相对于干物质具有低盐含量。优选地,从超滤获得的浓缩的块茎蛋白质分离物符合上文对于渗滤保留物描述的所有参数,但另外具有表示为灰分的小于5重量%,优选小于3重量%,甚至更优选小于1重量%的盐含量。进一步优选地,钾含量小于4重量%,优选小于2重量%,更优选小于1重量%。

[0061] 超滤可以使用与用于渗滤相同或不同的设置来执行。因此,膜可以具有3-500kDa,优选5-300kDa,更优选5-200kDa,优选30-200kDa,更优选40-120kDa,甚至更优选50-100kDa的MWC0。在一个实施方案中,不依赖于用于渗滤的膜,MWC0可以为3-50kDa,优选5-25kDa,例如5-15kDa或15-25kDa,或50-200kDa,优选50-150kDa。

[0062] 优选的UF膜是聚砜(PS)、聚醚砜(PES)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚丙烯腈(PAN)、再生纤维素和聚丙烯(PP)膜,优选PES或PS膜,同样不依赖于用于渗滤的膜。优选的UF膜是各向异性UF膜。UF膜可以实现为管状、螺旋缠绕、中空纤维、板和框架,或者交叉旋转诱导剪切改变单元。更优选的UF膜是管状UF膜。

[0063] 通量也可以与在渗滤中获得的通量相同或不同,但一般如上文在渗滤下描述的。优选这样执行UF,以便获得浓缩的块茎蛋白质分离物,其具有的溶解固体的总量为0.5-25°Bx,优选5-22°Bx,更优选10-18°Bx,甚至更优选12-17°Bx,甚至更优选14-16°Bx。在进一步优选的实施方案中,溶解固体的总量可以直至30°Bx、直至40°Bx或直至50°Bx。

[0064] 在优选实施方案中,与用于渗滤相同的设置也用于超滤。因此,膜、通量以及其它工艺和设备参数优选是相同的。这增加了工艺操作效率。

[0065] 天然块茎蛋白质分离物随后可以进行干燥,以获得天然块茎蛋白质粉末。干燥可以通过本领域已知的任何手段,优选通过喷雾干燥或冷冻干燥来执行。任选地,天然块茎蛋白质分离物在干燥之前进行优选通过反渗透、蒸发或冷冻浓缩的进一步浓缩步骤。如何实现这一点已在其它地方进行描述,并且是一般已知的。

[0066] 更优选在干燥之前,将块茎蛋白质分离物调整到5.5-7.0,优选6.0-7.0的pH。这增加了天然块茎蛋白质粉末的稳定性,其促进贮存。

[0067] 此外优选将块茎蛋白质分离物、特别是浓缩的水性块茎蛋白质分离物的pH调整到高于2.5,优选高于2.75。这是优选的,对于稳定蛋白质溶液的粘度,并避免在干燥之前的贮存期间的溶液胶凝。优选地,此类pH值用于包含块茎蛋白酶抑制剂的块茎蛋白质分离物。

[0068] 另外,还可以将浓缩的块茎蛋白质分离物的pH调整到低于4.0,优选低于3.5,更优选低于3.0,同样是为了在干燥之前的贮存期间稳定蛋白质溶液的粘度。优选地,此类pH值用于包含块茎patatin的块茎蛋白质分离物。

[0069] 为了有效地执行本渗滤方法,重要的是使用相对干净的渗滤进料溶液,其包含如

本文定义天然块茎蛋白质。在本上下文中的干净的渗滤进料溶液根据步骤a和b获得。

[0070] 在本方法的步骤a中,加工至少一个块茎,以获得包含块茎蛋白质的水性液体。这可以被称为块茎加工水。这种加工包含例如块茎的制浆、捣碎、锉磨、研磨、压制或切割,以及任选地与水的组合,以便获得包含天然块茎蛋白质的所述块茎加工水。

[0071] 水性液体可以包含淀粉,并且优选进行例如通过如本领域已知的倾析、旋流或过滤的淀粉去除步骤,以获得包含天然块茎蛋白质的块茎加工水。在该实施方案中,块茎加工水优选是来自淀粉工业的副产品,例如如在马铃薯工业中的淀粉分离后获得的马铃薯汁(PFJ)。

[0072] 在其它实施方案中,块茎可以通过切割进行加工,以形成其为加工块茎产品的基础的形状,例如片和条,优选来自马铃薯。当在水的存在下执行时,此类切割产生包含天然块茎蛋白质的块茎加工水。

[0073] 在一个此类实施方案中,块茎可以通过水射流进行加工,以切割块茎。在另一个实施方案中,块茎可以通过切割刀进行加工,例如在水的存在下。起因于此类切割过程的水包含天然块茎蛋白质,并且是步骤a的意义上的进一步优选类型的块茎加工水。

[0074] 在步骤b中,对块茎加工水进行至少一个预处理步骤,例如浓缩、稀释、pH调整、絮凝、固体去除和/或热处理,产生包含天然蛋白质的预处理的块茎加工水。这些步骤可以以任何次序执行。固体去除涉及从溶液中去掉小的不溶性颗粒的方法。这些不溶性颗粒包括脂质、不溶性蛋白质、残留细胞壁碎片、小淀粉颗粒或其碎片、微生物和土壤颗粒(的聚集体)。预处理是重要的,以确保块茎加工水可以有效地进行加工,伴随蛋白质的很少(如果存在的话)降解或变性,并且防止过滤器和膜的堵塞、在加工设备的表面上的成膜和结垢,且确保高工艺稳定性和效率。

[0075] 块茎加工水的浓缩可以通过本领域已知的任何方法来实现,以去除过量的水。优选的方法是在相对低的温度下操作的那些方法,所述温度例如在40°C或更低,优选35°C或更低,更优选30°C或更低,甚至更优选25°C或更低。进一步优选地,浓缩预处理可以在高工艺速度下发生。用于浓缩块茎加工水的优选方法是超滤、反渗透和冷冻浓缩,优选超滤。这些方法是本领域已知的。

[0076] 在一个实施方案中,通过冷冻浓缩来实现浓缩。冷冻浓缩可以如WO 2017/146568中所述的或通过本领域已知的其它方法执行。

[0077] 在另一个实施方案中,通过反渗透来实现浓缩。反渗透可以使用RO膜来执行,所述RO膜没有可检测的孔,如本领域已知的。RO膜基于溶质在膜材料中的不同溶解度来分离溶质,如本领域众所周知的。RO通量一般可以与通过DF(或UF)的通量相同,例如2-50,优选5-30,更优选 $10-251 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 的通量。

[0078] 在一个进一步更优选的实施方案中,通过超滤来实现浓缩预处理。超滤具有它可以在高通量下操作,同时是成本效益的优点。操作通量可以为例如3至 $1501 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间,优选5至 $501 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间,优选7至 $301 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间,甚至更优选9至 $201 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 之间。在优选实施方案中,超滤作为连续(错流)过程执行。

[0079] 用于超滤预处理中的优选膜是聚砜(PS)、聚醚砜(PES)、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚丙烯腈(PAN)、再生纤维素和聚丙烯(PP)膜,优选PES和PS膜。优选的膜具有3-500kDa,优选5-300kDa的分子量截断值(MWCO)。

[0080] 在具有相对少量悬浮固体的块茎加工水(例如具有少量细胞碎片和/或已经经历固体去除步骤的汁液)的超滤的情况下,膜优选具有3-100kDa,例如5-50kDa,更优选5-20kDa的MWC0。

[0081] 在具有相对大量悬浮固体的块茎加工水(例如具有大量细胞碎片且尚未经历固体去除步骤的汁液)的超滤的情况下,优选的膜具有20-300kDa,优选50-150kDa的MWC0。

[0082] 用于超滤预处理的进一步工艺条件可以与上文对于渗滤定义的相同。在优选实施方案中,使用与渗滤步骤相同的设置执行超滤预处理。即,所有超滤步骤优选使用5-300kDa,优选30-200kDa,更优选40-120kDa,甚至更优选50-100kDa的膜来执行。“所有超滤步骤”应解释为表示如果存在超滤步骤,则优选使用所述膜类型来执行超滤。替代的措辞可以为超滤(如果存在的话)使用所述膜类型来执行。

[0083] 块茎加工水的稀释可以通过本领域已知实现稀释的任何方法来实现。因此,块茎加工水可以用(自来水或软化水)、缓冲液或者酸或碱溶液进行稀释。在一些实施方案中,可以使用上述方法和设置,通过作为预处理步骤的渗滤来实现稀释。

[0084] 预处理可以包括一次或多次pH调整。如本领域已知的,可以通过添加适当的酸或碱来实现pH调整。合适的酸或碱可以包含例如盐酸、柠檬酸、乙酸、甲酸、磷酸、硫酸和乳酸,并且合适的碱是例如氢氧化钠或氢氧化钾、氯化铵、碳酸钠或碳酸钾、钙和镁的氧化物和氢氧化物。

[0085] pH调整可以发挥各种目的。pH的调整可以用于改变溶液的电导率,并且也可以影响蛋白质溶解度。在本上下文中,pH调整不应产生蛋白质完全变性,如例如在蛋白质的酸凝固中。然而,块茎加工水的pH调整可能产生蛋白质的部分沉淀、或块茎加工水的其它组成成分的沉淀,所述沉淀随后可以通过固体去除步骤进行去除。

[0086] 例如,pH调整至4.0-5.5可以用于沉淀patatin级分的至少部分,特别是在高浓度下,例如在块茎加工水中5-20重量%蛋白质的浓度下,以便获得包含相对大量的天然蛋白酶抑制剂的块茎加工水。随后可以在如其它地方定义的固体去除步骤过程中去除沉淀的蛋白质。这增加了天然块茎蛋白质分离物中的天然蛋白酶抑制剂的相对数量。

[0087] 絮凝可以通过添加适当的絮凝剂来实现,所述絮凝剂例如Ca(OH)₂、阳离子或阴离子聚丙烯酰胺、壳聚糖或角叉菜胶。这是本领域已知的。也可以使用例如W02016/036243中描述的方法。在絮凝之后,优选例如通过倾析、过滤、离心、旋流或微滤来执行固体去除步骤。

[0088] 热处理也可以作为预处理应用,前体是热处理并不产生蛋白质完全凝固。例如,在40-55℃下1-120分钟的热处理可以去除显著部分的patatin,其随后可以通过固体去除步骤去除。另外,已知来自块茎的蛋白酶抑制剂具有比patatin更高的热稳定性,并且加热可能产生patatin的部分或完全变性。因此,加热步骤可以例如与固体去除步骤组合执行,以获得富含天然蛋白酶抑制剂的块茎加工水。例如,在60-80℃,优选70-73℃下的热处理可以用于沉淀patatin级分的至少部分,其可以随后为固体去除步骤,以便分离富含天然蛋白酶抑制剂的天然块茎蛋白质。

[0089] 在本上下文中,固体去除可以加上如上所述的另一个预处理步骤并且优选在另一个预处理步骤之后执行,但也可以作为唯一的预处理步骤执行。如此处定义的固体去除也可以在本方法的另一点执行。然而,优选地,在预处理期间执行固体去除。预处理优选包含

固体去除步骤。

[0090] 在本上下文中,固体去除优选是过滤、离心、旋流、倾析、纳米过滤或微滤步骤,最优选微滤。这些步骤可以如本领域已知的执行。

[0091] 在本文实施方案的任一个中,但特别是在其中固体去除是唯一的预处理步骤的实施方案中,微滤(MF)是更优选的预处理。可以执行微滤以便实现细颗粒与液体的分离。可以用各种膜进行微滤,所述膜例如聚砜、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚丙烯腈(PAN)和聚丙烯(PP),以及陶瓷膜例如氧化锆或氧化钛或氧化铝膜。MF优选在孔径为0.1-10 μm ,优选0.2-4 μm ,更优选0.3-1.5 μm 的膜上执行。

[0092] MF可以在恒定压力或恒定流量下操作。压力可以在1.5巴直至5巴之间变化。通量可以为0至3501 $\cdot(\text{h}\cdot\text{m}^2)^{-1}$,优选45至3501 $\cdot(\text{h}\cdot\text{m}^2)^{-1}$ 。微滤产生针对半水(demiwater)空白(blank),在微滤液体的620nm处具有优选变得小于0.2,更优选小于0.1的吸光度的块茎加工水。

[0093] 在更优选的实施方案中,预处理包括微滤步骤。在其它更优选的实施方案中,预处理包括超滤步骤。在一个更优选的实施方案中,预处理仅包括微滤或由微滤组成。在一个进一步更优选的实施方案中,预处理包括以下或由以下组成:超滤和后续微滤、或微滤和后续超滤。

[0094] 预处理产生相对干净的块茎加工水,其将是渗滤进料溶液。预处理优选产生针对半水空白,在620nm处具有小于0.2,更优选小于0.1的吸光度的渗滤进料溶液。预处理进一步优选产生具有如上定义的电导率和pH的渗滤进料溶液。渗滤进料溶液的总溶解固体优选为2-10 $^{\circ}\text{Bx}$,更优选为3-8 $^{\circ}\text{Bx}$,例如4-6 $^{\circ}\text{Bx}$ 。总悬浮固体小于0.05体积%,优选小于0.25体积%,更优选小于0.01体积%。最优选地,基本不存在悬浮固体。在这方面,总悬浮固体通过以下进行测量:将样品离心,并且确定离心后沉淀物相对于上清液的体积%。

[0095] 在进一步更优选的实施方案中,该方法包括配糖生物碱去除步骤,以获得包含至多200mg/kg配糖生物碱的块茎蛋白质分离物。在此上下文中,配糖生物碱是定义为茄碱和查茄碱衍生物的总量的糖基化生物碱。该数量也可以被称为总配糖生物碱含量(TGA),并且可以根据Laus等人:(Laus M.C.,Klip G.&Giuseppin M.L.F. (2016) Food Anal. Methods 10 (4) "Improved Extraction and Sample Cleanup of Tri-glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine in Non-denatured Potato Protein Isolates")的方法进行确定。已知配糖生物碱对人是有毒的,因此应限制它们在块茎蛋白质分离物中的存在。

[0096] 配糖生物碱的去除是基本已知的,并且可以通过吸附到活性炭、疏水性树脂或各种类型的粘土,色谱法,酸提取,酶促转换或发酵来实现。示例性技术在WO 2008/056977和WO 2008/069651中进行描述。优选地,配糖生物碱通过吸附进行去除,例如通过使包含配糖生物碱的工艺流在包含合适吸附剂的柱上运行,所述吸附剂例如活性炭、疏水性树脂或各种类型的粘土。这可以在本方法中的任何点完成,但优选作为预处理步骤b的部分或在步骤c后执行。

[0097] 在进一步优选的实施方案中,该方法包括其中至少一个块茎在加工之前进行去皮的初始步骤。相应地,该方法提供了去皮块茎的加工。这具有所获得的块茎加工水干净得多的优点,并且因此在本渗滤方法之前需要更少的预处理。另外,块茎的去皮产生不同的蛋白质组成,因此所获得的天然块茎蛋白质富含氨基酸天冬氨酸和天冬酰胺、谷氨酸和谷氨酰

胺、酪氨酸、脯氨酸和精氨酸。

[0098] 在更优选的实施方案中,渗滤或超滤中的第一个提供了包含块茎游离氨基酸的透过物(permeate)。因此,第一渗滤或超滤步骤的透过物并不作为废物丢弃,而是分开加工以获得块茎游离氨基酸。此类加工优选包括优选通过喷雾干燥和/或冷冻干燥的干燥步骤,以得到块茎游离氨基酸粉末。干燥之前可以是浓缩步骤,例如通过在干燥之前的超滤、反渗透和/或冷冻浓缩,如其它地方描述的。

[0099] 本方法优选在工业规模上进行操作。因此,优选地操作本方法,以得到每小时至少5kg蛋白质,更优选每小时至少25kg蛋白质,甚至更优选每小时至少50kg蛋白质,潜在地直至每小时几吨。在优选实施方案中,本方法可以例如以10-750m³/小时,优选50-450m³/小时,更优选80-300m³/小时的速率进行操作。因此,优选地,该方法是其中所有步骤都连续操作(与分批式相反)的方法,例如以如本领域技术人员已知的“连续进料和排放配置”。

[0100] 在其中块茎加工水具有高蛋白质浓度,例如高于1重量%,优选高于1.5重量%的实施方案中,加工块茎加工水的方法优选包括微滤预处理,随后为如上文所描述的渗滤。优选地,该方法另外包括在微滤步骤之前或之后的絮凝步骤。在进一步优选的实施方案中,块茎加工水在渗滤步骤之前另外进行超滤步骤。在该实施方案中,该方法包括第一超滤步骤,随后为渗滤。在进一步的实施方案中,渗滤保留物可以在干燥之前通过超滤进行浓缩。第一超滤步骤和第二超滤步骤可以应用与上述相同的一般工艺条件,但无需是等同的工艺步骤。

[0101] 用于从包含高浓度蛋白质的块茎加工水中分离天然块茎蛋白质的优化工艺包括以下或由以下组成:以此次序的微滤、絮凝和渗滤步骤,或絮凝、微滤和渗滤步骤,或絮凝、微滤、超滤和渗滤步骤,或微滤、超滤和渗滤步骤。在更优选的实施方案中,该顺序由微滤、超滤和渗滤步骤组成。可替代地,步骤顺序包括以下或由以下组成:絮凝、微滤、超滤、渗滤步骤,或絮凝、超滤和渗滤步骤,其各自可以任选地随后为超滤。

[0102] 可以依照本文其它地方描述的参数执行所有列举的步骤。在这些实施方案中,絮凝步骤优选随后为固体去除步骤,优选离心。优选地,所有实施方案都在该过程的任意时间点补充有配糖生物碱去除步骤。这些方法各自可以包括干燥步骤,其任选地之前是优选通过超滤的浓缩步骤。

[0103] 在其中块茎加工水具有低蛋白质浓度,例如低于1.5,优选低于1重量%的实施方案中,该方法优选包括包含超滤的预处理,随后为如上文所描述的渗滤。优选地,该步骤顺序之前是微滤步骤。进一步优选地,渗滤保留物随后进行超滤。用于从包含低浓度蛋白质的块茎加工水中分离天然块茎蛋白质的优化过程由以下组成:如本文定义的后续微滤、超滤、渗滤和任选地超滤和/或干燥步骤,补充有在过程的任意点的配糖生物碱去除步骤。

[0104] 任选地,渗滤保留物或得自对渗滤保留物超滤的浓缩溶液可以进行例如通过吸附或色谱法的分馏步骤。已知这些方法将天然块茎蛋白质分离成蛋白酶抑制剂级分、patatin级分或总蛋白质级分。因此,此类方法可以应用于进一步纯化总块茎蛋白质分离物、或获得蛋白酶抑制剂分离物或patatin分离物。

[0105] 然而,在优选实施方案中,蛋白质分离无需蛋白质吸附步骤而实现。该方法优选不包括将蛋白质吸附至吸附剂的步骤,该步骤中蛋白质以高亲和力吸附至吸附剂(定义为与处理液体的其它组分相比,对于吸附剂具有更高亲和力的蛋白质)。该方法优选不包括蛋白

质吸附-洗脱过程或蛋白质色谱法,例如膨胀床吸附(EBA)过程、膜吸附过程或色谱法步骤。

[0106] 此外,该方法还优选不包括变性步骤。在更优选的实施方案中,执行该方法,以便在预处理、渗滤和干燥之前的任何其它步骤期间,将块茎加工水的温度保持低于40℃。这有助于及时实现蛋白质溶液的粘度稳定性,并且还避免了蛋白质的变性。另外,本方法优选不包括进一步的变性步骤,也不包括高剪切步骤,例如微粒化步骤。

[0107] 用本方法分离的蛋白质

[0108] 本方法具有超过用于分离天然块茎蛋白质分离物的已知方法的几个优点。蛋白质是更干净、更少降解且更少变性的(更天然的),并且具有改善的功能性质。另外,它没有异味,也没有砂砾样口感。

[0109] 用本方法分离的蛋白质是干净的、具有高蛋白质含量的天然蛋白质。它包含作为干物质百分比的至少75重量%的天然块茎蛋白质,优选至少80重量%,更优选至少85重量%,甚至更优选至少90重量%的天然块茎蛋白质。

[0110] 分离的蛋白质粉末溶解于软化水中的能力是关于变性程度的量度;变性蛋白质粉末不能溶解于水中,而天然蛋白质粉末可以溶解于水中。如用本方法分离(且随后干燥)的天然块茎蛋白质可以基本完全溶解于软化水中,这意味着至少55%的分离蛋白质可以重新溶解于软化水中,优选至少65%,更优选至少75%,甚至更优选至少85%或甚至至少90%。

[0111] 功能性质包括溶解度与它在自然界中存在的在块茎内部的蛋白质性质进行比较。另外,乳化性质是不受影响的。

[0112] 另外,蛋白质包含至多1.0重量%的葡萄糖、果糖和蔗糖总量,至多1重量%的块茎游离氨基酸,至多10mg/kg,优选至多5mg/kg的亚硫酸盐,至多200mg/kg,优选至多100mg/kg,更优选至多50mg/kg,甚至更优选至多25mg/kg的配糖生物碱,至多5mg/kg选自镉、汞、铅和砷组成的组的重金属,以及至多10%,优选至多5重量%的氯化物盐。优选地,灰分含量小于5重量%,优选小于3重量%,更优选小于1重量%。

[0113] 低糖含量和低游离氨基酸含量是重要的,因为糖类例如葡萄糖、果糖和蔗糖是还原糖,其与游离氨基酸反应可以形成吡嗪,而吡嗪是异味的重要贡献者。

[0114] 优选地,相对于组合物的干重,糖含量低于1.0重量%,优选低于0.5重量%,更优选低于0.1重量%,更优选低于0.05重量%。进一步优选地,相对于组合物的干重,分离物包含至多1重量%的块茎游离氨基酸,更优选至多0.5重量%,甚至更优选至多0.1重量%的游离氨基酸,甚至更优选至多0.05重量%的游离氨基酸。

[0115] 本方法有利地减少了糖类和游离氨基酸两者的数量。此外,针对盐溶液的渗滤提供了这样的条件,其中蛋白质得到稳定,并且因此在渗滤期间的被迫机械相互作用期间不降解或几乎不降解。这使进一步的游离氨基酸的形成降到最低。

[0116] 此外,本方法具有使所获得的块茎蛋白质分离物中的亚硫酸盐存在降到最低的效​​果。亚硫酸盐使块茎蛋白质溶液不稳定,但照常规在淀粉加工过程中加入块茎加工水中,以便防止块茎加工水的氧化,并且由此防止颜色形成。本方法有效地去除亚硫酸盐,因此使粘度稳定性增加。

[0117] 在优选实施方案中,该方法包括从块茎蛋白质分离物中去除盐,特别是源自块茎的盐、和/或已在渗滤步骤过程中加入的盐。这可以如上所述实现,并且产生具有低灰分含量、低钾含量以及少量重金属的蛋白质。

[0118] 为了清楚和简明描述的目的,特征在本文中作为同一或分开实施方案的部分进行描述,然而,应了解本发明的范围可以包括具有所述的全部或一些特征的组合的实施方案。本发明现在将通过下述非限制性实施例进行说明。

[0119] 实施例

[0120] 配糖生物碱(总配糖生物碱或TGA)基本根据Laus及同事的方法(Laus M.C.,Klip G.&Giuseppin M.L.F. (2016) Food Anal.Methods 10 (4) “Improved Extraction and Sample Cleanup of Tri-glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine in Non-denatured Potato Protein Isolates”)进行确定。

[0121] 简言之,样品在含有20mM庚烷磺酸钠盐(VWR 152783K)的5%乙酸溶液中溶解或稀释至少2小时。通过在环境温度下以9000g离心(Heraeus Multifuge 1SR,转子75002006)去除不溶性材料,并且上清液经过具有0.45 μ m GHP Membrane的GHP Acrodisc 13mm注射器过滤器直接过滤到1.5mL HPLC小瓶(VWR 548-0004)内,并且用铝质ci 11mm、橡胶/丁基/TEF盖子(VWR 548-0010)盖上。经由Robotlon在线SPE系统(Separations),将样品自动引入SPE柱(Oasis HLB prospect-2/Symbiosis药液筒2.0x 10mm粒径30 μ m)上。将配糖生物碱洗脱到Hypersil ODS C18(250mm \times 4.6mm 5 μ m)柱上,并且使用50%乙腈/磷酸盐缓冲液pH 7.6进行分离。使用Smartline UV检测器2520(Knauer)检测分析物,并且在由纯化的配糖生物碱(α -茄碱、Carl Roth 4192,1和 α -查茄碱Carl Roth 2826,1)制备的校准曲线上进行定量。

[0122] 根据ISO 17294-2:2016,通过电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)测定金属。

[0123] 对于原子序数高于钠的所有元素,元素组成经由X射线荧光(XRF),经由Rigaku CG ED-XRF(Rigaku)进行确定。

[0124] 灰分通过将样品在550 $^{\circ}$ C下焚烧并称重残渣进行确定。

[0125] 根据制造商的说明书,用Megazyme SuFrG试剂盒执行糖类的确定。

[0126] 总悬浮固体(TSS)的数量可以通过测定干物质含量为4.5重量%的汁在620nm处的吸光度进行确定。

[0127] 溶解固体的数量可以通过在PAL α 手持式数字折射仪(AT 3840,Atago)中测量其进行确定。

[0128] 通过将样品稀释至5.0 $^{\circ}$ Bx(对应于4.5重量%的干物质),并且在Eppendorf离心机中以14.000rpm离心10分钟以去除不溶物,来确定在620nm处的吸光度。其白利值(brix value)低于5的样品按原样离心。将每个样品的1mL上清液的等分试样引入比色皿中,并且置于BioRad SmartSpec Plus分光光度计中。相对于半水空白,在620nm处一式两份读取吸光度。

[0129] 电导率可以通过HI 98312电导率计(Hanna Nindustries,荷兰)在室温下进行确定,如本领域众所周知的。适当时,电导率也可以基于溶质的各种浓度通过计算进行确定,如本领域已知的。

[0130] 蛋白质浓度可以通过凯氏(Kjeldahl)测量进行确定。氮数然后通过乘以6.25而转换成蛋白质含量。

[0131] 使用CEM Sprint快速蛋白质分析仪确定真实蛋白质含量。该方法基于带负电荷的染料(iTAG)与酸性条件下蛋白质中存在的带正电荷的氨基酸赖氨酸、精氨酸和组氨酸的相

相互作用。染料的疏水性促使蛋白质沉淀,并且在480nm处的染料吸附损失通过使用由凯氏分析制备的校准曲线转化为蛋白质含量,所述凯氏分析对充分干净的蛋白质制剂执行。含氮化合物例如单氨基酸和小肽并不由染料溶液沉淀,并且结果,并不影响蛋白质含量测量。

[0132] 含水量报告为干燥失重,并且通过将含有1至10克样品的铝样品盘(VWR 611-9000)引入设定为100°C的HG83卤素干燥器(Mettler Toledo)中10分钟进行确定。

[0133] 在实验中,在渗滤过程中频繁使用下述盐溶液:0.5重量%NaCl(电导率8.2mS/cm);0.5重量%KCl(电导率8.2mS/m);0.33重量%NaCl(电导率5.3mS/cm);

[0134] 通过Experion的蛋白质组成

[0135] 使用Experion Pro260自动化电泳站(Bio-Rad,USA)来确定蛋白质组成。首先将试剂平衡至室温并短暂涡旋,这之后试剂在离心机上以10000×g向下旋转5分钟。在此之后,制备凝胶和凝胶染色溶液,其中前者并不需要试剂的混合,而其中后者通过将20μL染色试剂与520μL凝胶试剂混合进行制备。然后将两种溶液涡旋,并且在配备有0.2μm过滤器的Eppendorf杯中以10000×g向下旋转5分钟。随后,通过将30μL样品缓冲液与1μLβ-巯基乙醇混合来制备样品缓冲液。随后通过将4μL样品/梯与2μL样品缓冲液混合,并且随后涡旋且以10000×g离心5分钟,来制备样品和梯。随后用84μL超纯水稀释样品和梯。通过运行程序B3,Experion芯片在启动站上用12μL凝胶染色溶液启动。随后,将12μL凝胶染剂和凝胶溶液移液到相应的芯片孔中。将6μL梯移液到experion芯片上的梯孔中。随后,将6μL每个样品加载到样品孔1-10中。最后,通过将experion芯片加载到Experion Pro260并运行Protein 260分析,来起始分析。在分析后使用清洁芯片来清洁电极。

[0136] 实施例1

[0137] 使用以各种pH和电导率的模型溶液,来评估盐浓度对蛋白质聚集和沉淀趋势的作用。模型溶液包含纯化的蛋白酶抑制剂和纯化的patatin(通过色谱法获得并且广泛透析的)。

[0138] 将蛋白质以1重量%的总蛋白质浓度,质量比为1:1的纯化蛋白酶抑制剂和纯化的patatin溶解于30mM柠檬酸钾缓冲液中。根据需要通过HCl(1M)或NaOH(1M)来调整pH。通过添加氯化钾,将电导率设定为2、12或50mS·cm⁻¹。使样品在环境温度下温育1小时,并且在Eppendorf离心机中以14000rpm的10分钟过程中进行离心,以去除沉淀的蛋白质。上清液在100mM NaOH溶液中稀释25倍。相对于100mM NaOH空白,蛋白质浓度在BioRad Smartspec Plus分光光度计上在280nm处读取,并且表示为可溶性蛋白质的百分比。结果显示了在低电导率下,根据pH的强pH依赖性的马铃薯蛋白质溶解度,而在较高电导率下,pH效应是减少或消除的(参见图1)。

[0139] 实施例2

[0140] 使用以各种pH和电导率的模型溶液,来评估在机械应力下盐浓度对蛋白质聚集和沉淀趋势的作用。模型溶液包含以1:1摩尔比的纯化的蛋白酶抑制剂和纯化的patatin(通过色谱法获得并且广泛透析的)。

[0141] 将蛋白质以2和6重量%的总蛋白质浓度溶解于10mM柠檬酸盐缓冲液中。缓冲液用NaOH或HCl溶液进行稀释,以将pH设定至6.0或7.0。向所得到的溶液中,加入固体KCl以便将电导率设定为2、5、12和50mS·cm⁻¹。将溶液以10000×g离心5分钟,以去除不溶性蛋白质,并且随后为设定为1.5和4重量%的最终蛋白质浓度(在PI级分上校准)。蛋白质溶解度关于每

个级分分别进行确定,并且随后求平均值以反映马铃薯汁液中的天然变异性。

[0142] 最终的蛋白质溶液在室温下温育1小时,同时用机械搅拌器剧烈搅拌,以模拟如在渗滤过程中发生的机械力。随后将蛋白质混合物以 $10000 \times g$ 离心5分钟,并且确定去上清液中的蛋白质浓度。通过聚集的蛋白质损失通过起始蛋白质浓度和最终蛋白质浓度之间的差异进行计算。结果显示于图2中。

[0143] 结果显示了即使在机械应力下,马铃薯总蛋白在增加的电导率下也是高度可溶的。电导率应该为至少 $5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$,优选至少 $8\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。为了避免在渗滤过程中的过量盐添加,电导率优选低于 $20\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$,更优选低于 $18\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。优选的电导率为 $8-15\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$,优选 $9-14\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

[0144] 实施例3

[0145] 在淀粉和纤维去除后从马铃薯块茎获得的块茎加工水(马铃薯加工水),用作用于在中试规模下生产总天然蛋白质分离物的原料。对马铃薯加工水进行固体去除预处理((a)和(b)),或絮凝预处理随后为固体去除(c)。在所有情况下,加工在 $100-250\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速下发生)。

[0146] (a) 马铃薯加工水在常规连续堆叠盘式离心机中进行离心。颗粒的进一步去除使用配备有硅藻土作为助滤剂的死端式过滤来实现。离心的马铃薯加工水贮存于罐中,以等待进一步加工。

[0147] (b) 的马铃薯加工水进行使用孔径为0.8微米的陶瓷膜的微滤步骤,并且在大约 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度和 $100\text{l} \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 的恒定通量下操作。微滤的马铃薯加工水贮存于罐中,以等待进一步加工。

[0148] (c) 如WO 2016/036243A1中所述,马铃薯加工水用阳离子絮凝剂和阴离子絮凝剂的混合物进行预处理。在圆盘堆叠式离心机中,从马铃薯加工水中分离固体。在离心机的底部处的污泥被丢弃,而离心机的上清液用作渗滤的进料。获取絮凝的马铃薯加工水的样品,以跟踪作为絮凝质量指示的修改污泥体积指数(SVI)。还检查了上清液在620nm处的吸光度。絮凝的马铃薯加工水贮存于罐中,以等待进一步加工。

[0149] 这些预处理步骤的特性显示于表1中。

[0150] 表1:在各种预处理后马铃薯加工水的特性

	流量入口PJ ($\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$)	SVI ($\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$)	吸光度620 nm
	100	49	0.077
[0151]	150	64	0.076
	200	63	0.082
	250	71	0.104

[0152] 因此预处理的马铃薯汁任选地进行TGA去除。TGA去除在填充有颗粒活性炭(C-GRAN, Norit)的柱中进行。在执行TGA去除之前,活性炭柱在软化水中预浸泡24小时。使用2小时接触时间,使预处理的马铃薯汁液通过柱。

[0153] 在所有情况下,预处理另外包括在渗滤之前的超滤步骤。马铃薯加工水使用截留

分子量 (MWC0) 为 5kDa 的螺旋缠绕膜进行超滤, 以便获得溶解固体含量为 9.9 至 21.8 °Bx 的浓缩的马铃薯蛋白质溶液。

[0154] 表 2. 获得天然蛋白质分离物的处理和工艺条件。

[0155]

操作		1	2	3	4	5	6	7
预处理		MF、UF	MF、UF	絮凝 离心 UF	离心 UF	絮凝 离心 UF	絮凝 离心 UF	絮凝 离心 UF
		b	b	c	a	c	c	c
MF 通量	($l \cdot (h \cdot m^2)^{-1}$)	100,0	100,0					
MF TMP*	(巴)	0.5 - 2.5	0.5 - 2.5					

[0156]

UF 通量	($l \cdot (h \cdot m^2)^{-1}$)	10,0	13,0	12,0	13.8	12.4	12.6	13.2
T	(°C)	16.4	21.9	21,0	22.5	21.5	19.8	1.02 - 1.06
UF TMP* 起始-终止	(巴)	1.04 - 1.07	1.04 - 1.06	-	1.05 - 1.07	1.02 - 1.06	1.02 - 1.05	15.7
固体起始- 终止	(°Bx)	5.9 - 10.8	5.1 - 15.3	5.6 - 15.2	5.9 - 10.3	5.5 - 15.3	5.9 - 10.0	5.3 - 10
σ 起始-终 止	($mS \cdot cm^{-1}$)	13.6 - 13.0	9.5 - 10.8	9.5 - 10.9	8.7 - 9.1	10.7 - 10.1	10.5 - 10.3	9.5 - 10.7
渗滤								
V _{DF} : V _{PJ}	-	3 : 1	4 : 1	3 : 1	3 : 1	4 : 1	3 : 1	3 : 1
[盐]	(%)	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.66	0.33
通量	($l \cdot (h \cdot m^2)^{-1}$)	13,0	8.5	10,0	14.9	9,0	14.2	8.8
TMP*起 始-终止	(巴)	1.05 - 1.12	1.04 - 1.1	-	1.03 - 1.12	1.04 - 1.09	1.02 - 1.09	1.02 - 1.05
T	(°C)	18.5	20.5	22,0	24.7	22.7	22.6	18.5
固体起始- 终止	(°Bx)	10.8 - 15.9	15.3 - 15.7	15.2 - 16	10.3 - 19.3	15.3 - 16.8	10.0 - 16.8	10 - 9.9
σ 起始-终 止	($mS \cdot cm^{-1}$)	13.0 - 5.5	10.8 - 5.44	10.9 - 5.3	9.1 - 5.1	10.1 - 4.5	10.3 - 8.4	10.7 - 6.5
TGA 去除		是	否	是	是	是	是	是
干燥		喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	喷雾	冷冻
分析								
凯氏蛋白 质	(%)	84.8	80.7	83.7	81.1	85.5	82.2	79,0
MW < 35 kDa	(%)	58.1	55,0	77.4	81.6	66.1	83.2	54.2
含水量	(%)	7.73	6.95	8.43	9.24	5.51	7.72	7.62
总 TGA 含 量	(ppm)	120	475	-	43	96.5	26	48
亚硫酸盐	(ppm)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	7,0
总重金属	(ppm)	0.53	0.69	0.61	1.19	0.73	0.79	0.59

[0157] *跨膜压

[0158] 对来自超滤的保留物进行进一步处理,其包括针对具有0.33或0.66重量%NaCl的盐溶液、以进料/盐溶液的不同比率(1:3-1:4)的渗滤。这得到马铃薯蛋白质分离溶液。在超滤和渗滤步骤期间,pH保持在 6.3 ± 0.3 下。最终浓缩物通过喷雾干燥($SD, T_{\lambda} 175^{\circ}C, T_{\text{出}} 75^{\circ}C$)或冷冻干燥进行干燥。条件概括显示于表2中。

[0159] 从超滤和针对盐溶液的渗滤获得的马铃薯蛋白质分离物的就电导率和溶解固体的浓度($^{\circ}Bx$)进行表征。干燥产物已关于蛋白质含量(凯氏)、含水量、蛋白酶抑制剂的相对数量、TGA含量、亚硫酸盐和重金属进行分析。

[0160] 表2显示了不同工艺参数对蛋白质分离物的质量的影响。所有不同的预处理都可以在渗滤之前成功地应用,但对最终浓缩的水性蛋白质分离物或干燥产物的最终质量没有显著影响,条件是渗滤针对盐溶液执行。需要TGA去除步骤,以获得具有所需低TGA水平的马铃薯蛋白质。

[0161] 实验5显示了,当马铃薯加工水以更高的稀释因子(1:4)进行渗滤时,蛋白质分离物的电导率小于其中应用1:3稀释因子的实验中的电导率。在干燥后,来自实验5的产物也具有最高的蛋白质含量。

[0162] 如实验6中完成的,当盐浓度从0.33%增加到0.66%时,蛋白质分离物的电导率更高。然而,来自实验6的干燥蛋白质分离物的TGA含量小于其它实验获得的TGA含量。该表还显示了蛋白质分离物可以通过各种方法进行干燥,所述方法例如喷雾干燥(实验1-6)或冷冻干燥(实验7)。在所有情况下,都已获得了具有79%直至85.5%的高蛋白质含量的产物。

[0163] 实施例4

[0164] 在淀粉和纤维去除后从马铃薯块茎获得的块茎加工水(马铃薯加工水),用作用于在中试规模下生产天然总马铃薯蛋白质分离物的原料。对马铃薯加工水进行使用孔径为0.8微米的陶瓷膜的固体去除预处理微滤步骤,并且在大约 $23 \pm 2^{\circ}C$ 的温度和 $1001 \cdot (h \cdot m^2)^{-1}$ 的恒定通量下操作。微滤的马铃薯加工水(MF-PFJ)贮存于罐中,以等待进一步加工。

[0165] 在所有情况下,对微滤的PFJ($4.2-5.0^{\circ}Bx$ 和 $12mS/cm$)进行使用分子量截留(MWCO)为5kDa或50kDa的聚醚砜膜的超滤,产生溶解固体含量为 10.5 至 $28.2^{\circ}Bx$ 和电导率范围为 10 至 $16mS/cm$ 的保留物。

[0166] 随后对超滤PFJ的保留物进行TGA去除。任选地,保留物在TGA去除之前用软水进行稀释,以便获得溶解固体含量为 10.5 至 $12.9^{\circ}Bx$ 之间且 6 至 $13mS/cm$ 的蛋白质溶液。TGA去除使用填充有疏水性树脂的四个柱在室温下在 $6-6.5$ 的pH下进行。在TGA去除后,获得具有 $8-13mS/cm$ 的电导率的蛋白质溶液,其任选地浓缩至范围为 $12-18^{\circ}Bx$ 的固体含量。

[0167] 使来自超滤的保留物进行进一步处理,其包括针对具有 $8.2mS/cm$ 的电导率、具有 0.5 重量%NaCl或KCl的盐溶液,以进料(V_{PJ})/盐溶液(V_{DF})的不同比率(1:1-1:2)的多重渗滤步骤。这得到马铃薯蛋白质分离溶液。最终浓缩物任选地通过喷雾干燥($SD, T_{\lambda} 175^{\circ}C, T_{\text{出}} 75^{\circ}C$)进行干燥。每个渗滤步骤都需要按如指示的比率用渗滤体积 V_{DF} 稀释蛋白质溶液体积 V_{PJ} ,并且通过超滤将稀释的蛋白质溶液浓缩回原始体积。条件概述显示于表3中。

[0168] 从超滤和针对盐溶液的渗滤获得的马铃薯蛋白质分离物就溶解固体的浓度($^{\circ}Bx$)进行表征。最终产物已关于蛋白质含量、含水量、蛋白酶抑制剂的相对数量、TGA含量、亚硫酸盐和重金属进行分析。

[0169] 表3显示了不同工艺参数对蛋白质分离物的质量的影响。所有不同的预处理都可以在渗滤之前成功地应用。此外,测试了不同的渗滤条件,显示了使用不同的盐溶液可以获得具有高质量的蛋白质分离物。

[0170] 实验8和9显示了在0.5% NaCl的盐浓度以及分别为1:1或1:2和1:1的蛋白质溶液/渗滤液比率下的渗滤,可以用于获得具有良好质量的马铃薯蛋白质分离物(84-86%)。图6显示了获得的总蛋白质分离物包含也存在于原材料中的所有蛋白质级分。

[0171] 在实验10中,对经微滤且超滤的PFJ进行使用0.5% KCl的五个分开的渗滤步骤-在TGA去除之前的两个以及在TGA去除之后的三个。与在渗滤过程中使用NaCl作为盐时相比,这些条件产生具有相似质量的蛋白质分离物。还参见图6。

[0172] 此外,实验11证实了,当使用MWC0为50kDa代替5kDa的UF和DF膜时,可以显著改善天然蛋白质分离物的质量。与使用MWC0为5kDa的膜时(参见实验8和9)的大约84%相比,此类条件产生具有94%真实蛋白质含量的蛋白质分离物。图6显示了获得的总蛋白质分离物包含也存在于原材料(MF-PFJ)中的所有蛋白质级分。

[0173] 表3

[0174]

	单位	8	9	10	11
预处理		MF、UF	MF、UF、	MF、UF、 DF、	MF、UF、
UF膜	kDa	5	5	5	50
pH起始-终止		5.9-6.1	5.9-6.3	6.1-6.6	6.2-6.5
固体起始-终止	°Bx	4.8-10.5	4.6-120.2	4.2-19	5.0-28.2
σ 起始-终止	$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$	12-13	12-13	12-16	12-10
稀释		否	是	是	是
固体	°Bx		12.9	12.4	10.9
σ	$\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$		10	9	6

渗滤					
DF膜	kDa	5	5	5	50
V _{DF} :V _{PJ}		1:1	2:1、1:1	1:1	1:1
DF步骤的Nr		5	2, 1	5	5
DF盐		NaCl	NaCl	KCl	NaCl
DF [盐]	(重量%)	0.5	0.5	0.5	0.5
pH起始-终止		6.1-6.2	6.3-6.6	6.6-6.7	6.5-6.5
固体起始-终止	°Bx	10.5-14.9	12.9-12.1	12.4-12.9	10.9-18.0
σ起始-终止	mS·cm ⁻¹	13-9	13-9	9-10	8-7
干燥		喷雾	喷雾	喷雾	喷雾
分析					
TPC	重量%	85.7	84	83	94
MW < 35 kDa	%		56	58	54
TNC	重量%	-	86	84	94
[0175] 总糖类	重量%	<0.5	<0.5	<0.54	<0.55
TFAA	重量%	0.83	0.56	0.05	0.98
亚硫酸盐	mg/kg	7.4			
TGA	mg/kg	142.8	112	27	39
镉	mg/kg	0.54	0.24	0.47	0.51
汞	mg/kg	<0.025	<0.01	<0.01	<0.01
铅	mg/kg	0.2	0.28	0.20	<0.1
砷	mg/kg	0.04	0.07	0.06	0.06
磷	mg/kg	-	5761	5721	2797
硫	mg/kg	-	14482	13269	13916
氯	mg/kg	-	24524	15865	15245
钾	mg/kg	-	6025	55385	6014
钙	mg/kg	-	2061	1154	280
铁	mg/kg	-	301	323	329
铜	mg/kg	-	80	67	57
[0176] 原始灰分	重量%	6.5	8.2	9.3	4.2

[0177] TNC:总氮含量;TPC:真实蛋白质含量;TFAA:总游离氨基酸

[0178] 实施例5

[0179] 在淀粉和纤维去除后从马铃薯块茎获得的块茎加工水(马铃薯加工水),用作用于在中试规模下生产天然马铃薯蛋白质蛋白酶抑制剂分离物的原料。对马铃薯加工水进行使用孔径为0.8微米的陶瓷膜的固体去除预处理微滤步骤,并且在大约 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度和 $1001 \cdot (\text{h} \cdot \text{m}^2)^{-1}$ 的恒定通量下操作。微滤的马铃薯加工水(MF-PFJ)贮存于罐中,以等待进一步加工。

[0180] 对微滤的PFJ进行使用截留分子量(MWCO)为5kDa的聚醚砜膜的超滤,以获得具有 19.2°Bx 的溶解固体含量的马铃薯蛋白质溶液。

[0181] 超滤PFJ的pH随后通过在搅拌下逐滴添加1M HCl溶液设定为3.0,以由于PFJ的patatin级分的沉淀而形成浆料。浆料以4200RPM离心10分钟且倾析。对上清液进行使用填充有疏水性树脂的四个柱在室温下在大约3.5的pH下的TGA去除,并且随后进行浓缩。使浓缩物针对6kDa膜进行渗滤,使用3倍的pH 3.5的柠檬酸盐缓冲液,随后为3倍的0.5% KCl溶液(浓缩物/渗滤液的比率为5:3),以获得 5.3°Bx 和90%蛋白酶抑制剂含量的蛋白质溶液(还参见图6)。

[0182] 结果概括于表4中。显示了在渗滤之前的pH调整致使具有良好质量的蛋白质分离物,反映为81.4%的真实蛋白质含量。进一步证实了,该方法允许获得富含马铃薯蛋白质酶抑制剂级分的天然马铃薯蛋白质分离物。

[0183] 表4:

[0184]

	单位	12
预处理		MF、UF、pH、固体
UF膜	kDa	5
pH起始-终止		6.0-3.1
固体起始-终止	$^\circ\text{Bx}$	4.8-8.3
σ 起始-终止	$\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$	12-23
渗滤		
膜	kDa	6

	$V_{DF}:V_{PJ}$		3:5
	盐		KCl
	[盐]	(%)	0.5
	pH起始-终止		3.1-3.7
	固体起始-终止		8.3-5.3
	σ 起始-终止	$mS \cdot cm^{-1}$	23-7
	干燥		无
	分析		
	真实蛋白质含量	重量%	81.4
	MW < 35 kDa	%	90
	总氮含量	重量%	81.4
	TGA	mg/kg	118
[0185]	镉	mg/kg	<0.23
	汞	mg/kg	<0.23
	铅	mg/kg	<2.3
	砷	mg/kg	<1.2
	磷	mg/kg	814
	硫	mg/kg	14535
	氯	mg/kg	43023
	钾	mg/kg	52326
	钙	mg/kg	1395
	铁	mg/kg	277
	铜	mg/kg	133
	原始灰分	重量%	9.3

[0186] 实施例6

[0187] 对微滤的PFJ (300L) 进行具有5kDa膜的超滤,以获得浓缩的蛋白质溶液 (35L, 22.7°Bx)。对浓缩的蛋白质溶液进行通过添加50L水的渗滤 (浓缩物/渗滤液的比率为7:10)。电导率从12mS/cm (在水添加之前) 降低到6.2mS/cm (在水添加之后)。将渗滤溶液再次浓缩 (35L) 并经受另外50L水,使得电导率进一步降低至3.5mS/cm。在水添加后,形成白色沉淀,并且溶液从澄清和橙色的转变为白色和乳状的,指示了蛋白质的沉淀。加入NaCl (250g),以再次获得澄清的橙色溶液,产生电导率增加至8mS/cm。

[0188] 图3中显示了通量-浓度图。根据该图可以得出,在第二体积的水添加后,通量减少了50%。这种通量减少指示了膜的堵塞。通量在NaCl添加后恢复,其指示了蛋白质再次溶解。

[0189] 这些结果证实了,必须将蛋白质溶液的电导率维持在高于至少5mS/cm,优选至少8mS/cm,以避免蛋白质的沉淀,产生蛋白质损失以及膜堵塞和结垢两者。这可以通过监测预处理的块茎加工水的电导率和/或通过监测盐溶液的电导率来实现。

[0190] 实施例7

[0191] 如在淀粉和纤维去除后从甘薯和去皮的木薯块茎获得的块茎加工水(甘薯和木薯加工水),用作用于生产天然总蛋白质分离物的原料。对加工水进行使用配备有10kDa MWC0膜的Amicon M-2000超滤池的固体去除预处理的超滤步骤。

[0192] 随后使超滤的甘薯汁液使用0.5% NaCl溶液(浓缩物/渗滤液的比率为1:5)针对10kDa MWC0膜进行渗滤。对浓缩物进行使用0.5% NaCl溶液的另外两个渗滤步骤(浓缩物/渗滤液的比率为1:2和1:1),以获得蛋白质溶液。

[0193] 使超滤的去皮的木薯汁液进行使用0.5% NaCl溶液(浓缩物/渗滤液的比率为1:1.5)针对10kDa MWC0膜的渗滤,以获得蛋白质溶液。

[0194] 处理的块茎汁液的化学组成显示于表中,并且与未处理的汁进行比较。

		原始甘薯汁	渗透浓缩物	原始木薯汁	渗透浓缩物	
[0195]	糖类	g/kg DM	122	30	767	388
	矿物质	g/kg DM	35	111	278	136
	灰分	g/kg DM	nm	146	nm	167
	钾	g/kg DM	23	nd	218	75
	氯	g/kg DM	6	86	6	33
	凯氏N*6.25	g/kg DM	85	669	307	241
	游离氨基酸	g/kg DM	12	nd	87	9
	真实蛋白质	g/kg DM	35	551	119	178

[0196] nd:未检测到

[0197] 结果显示了该方法成功地提供了具有高天然蛋白质含量的天然块茎汁液。在两种情况下,均观察到真实蛋白质含量的显著增加,同时污染物例如糖类和游离氨基酸的存在是基本上降低的。

[0198] 实施例8

[0199] 为了测试蛋白质在天然pH(6-6.3)和各种电导率下的溶解度,使用包含蛋白酶抑制剂和patatin的总马铃薯蛋白质。马铃薯蛋白质通过以下获得:马铃薯汁液的微滤、超滤至原始体积的10%、以及使用实施例4实验8的方案无需喷雾干燥且使用纯水的渗滤,直到保留物的电导率为8mS/cm。

[0200] 所得到的水性马铃薯蛋白质在电导率为3.7、5.3、6.7、9.2和14mS/cm的NaCl水溶液中进行稀释,以获得蛋白质浓度为1.3重量%的溶液。另外,进行用纯水的稀释,得到电导率为1.3mS/cm和蛋白质浓度为1.3重量%的马铃薯蛋白质溶液。

[0201] 随后,在离心前将溶液搅拌1小时。上清液中的蛋白质浓度通过sprint进行确定,并且与原始蛋白质浓缩物进行比较。结果显示于图4中。

[0202] 该实验显示了,如果电导率低于5mS/cm,则在包含蛋白酶抑制剂和patatin的水性混合物中的蛋白质沉淀是无法接受的。在渗滤过程中的电导率在任何时候都必须维持在高于5mS/cm,且更优选高于8mS/cm。

[0203] 实施例9

[0204] 对实施例8中所述的蛋白质分离物进行使用溶液针对电导率为1.34、3.65、4.72、5.25、6.72、8.72、9.2、12、14和49.5mS/cm的NaCl溶液的渗滤。

[0205] 结果展示于图5中。针对电导率小于5mS/cm的盐溶液的渗滤导致无法接受的沉淀。将电导率增加到高于5mS/cm,优选高于8mS/cm允许方便的蛋白质分离,其产生改善的蛋白质产物。

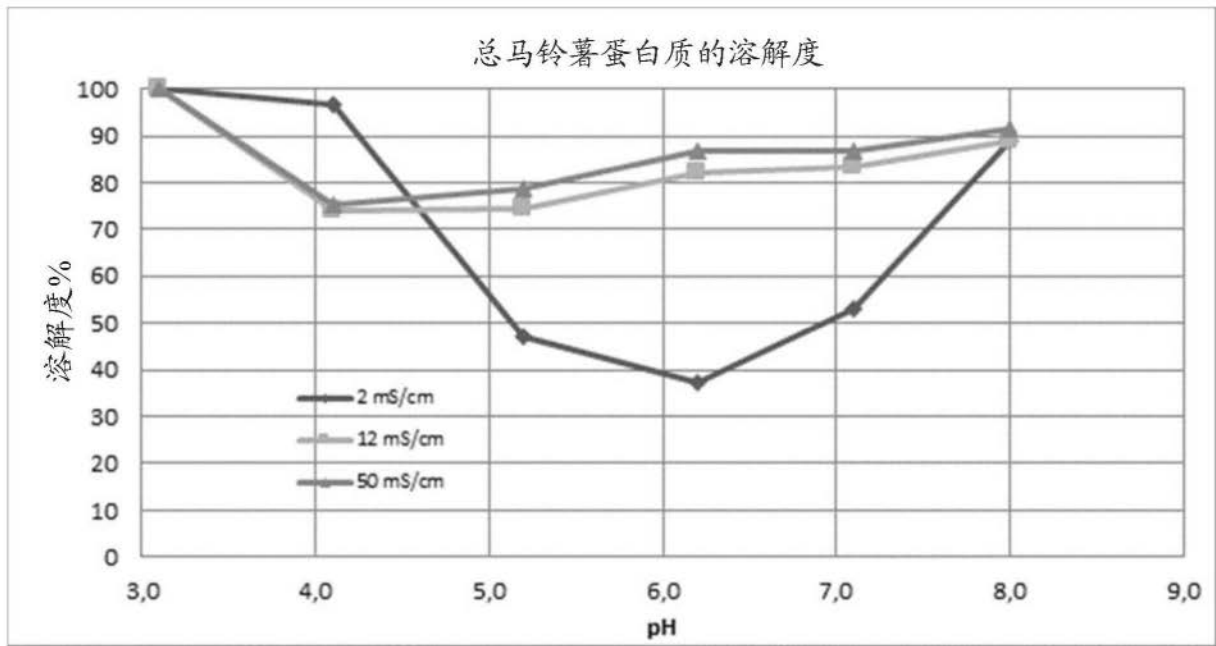


图1

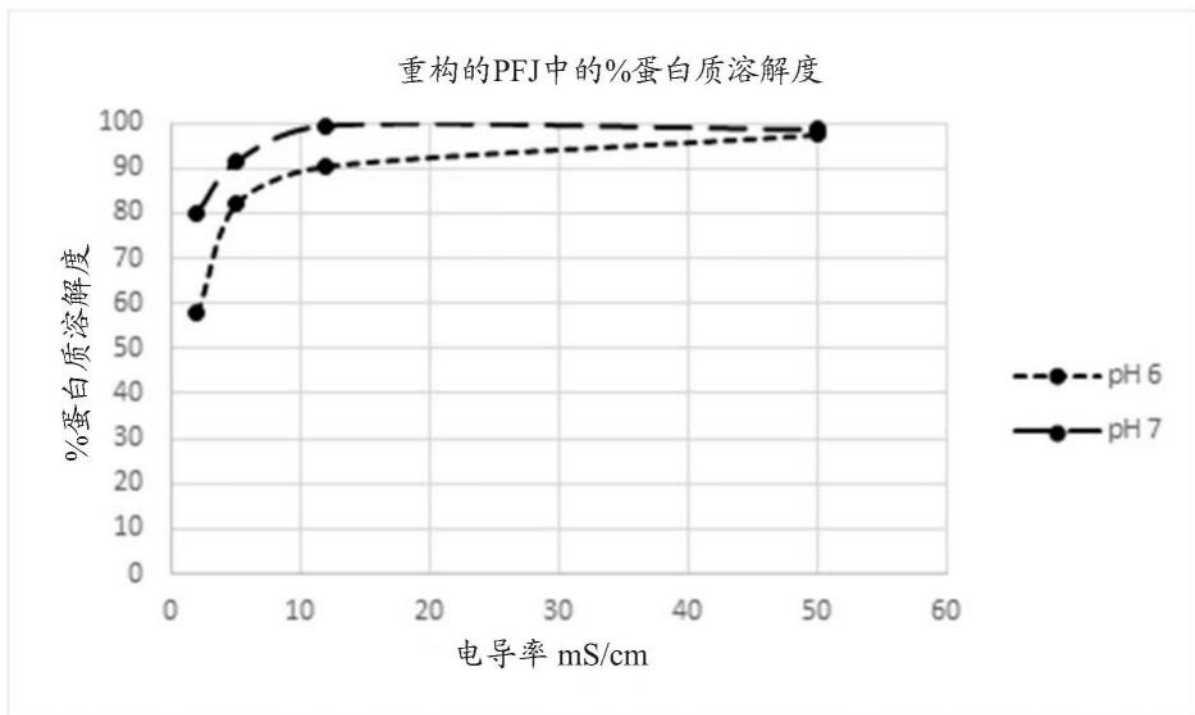


图2

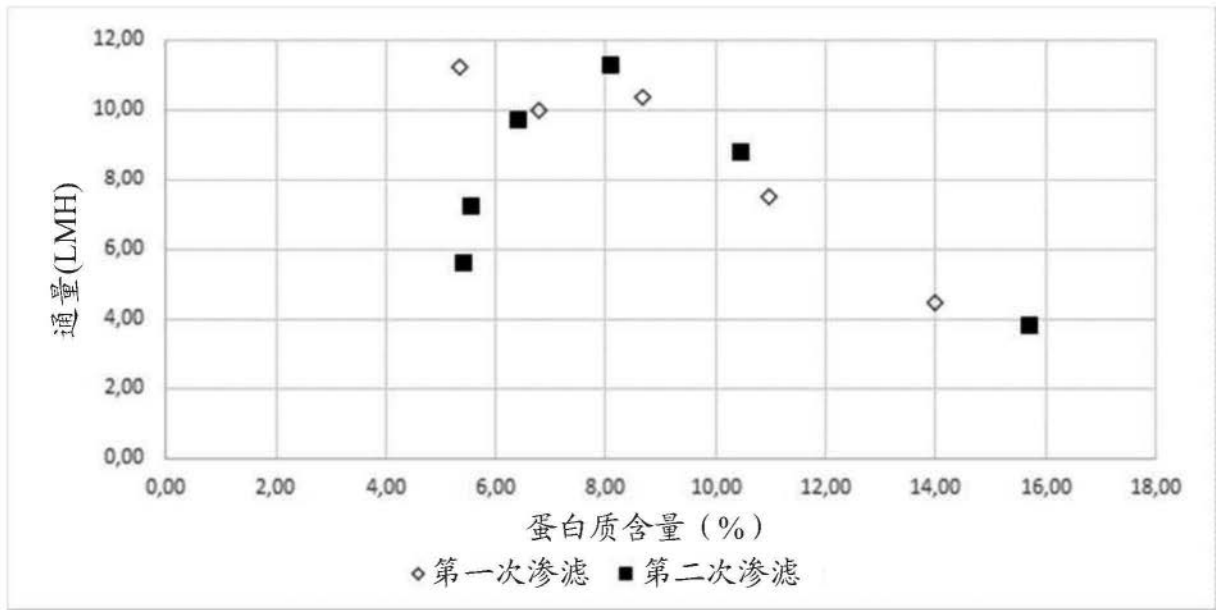


图3

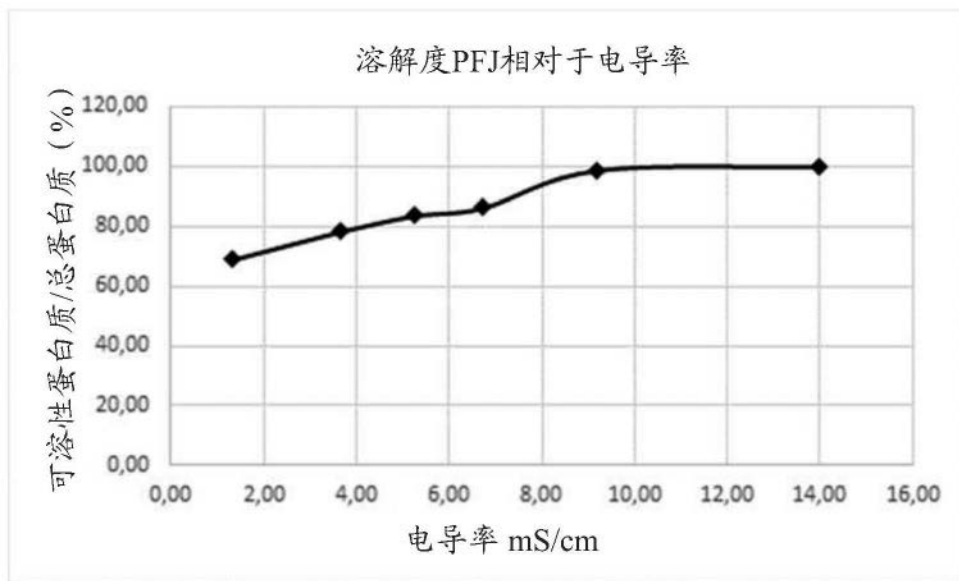


图4

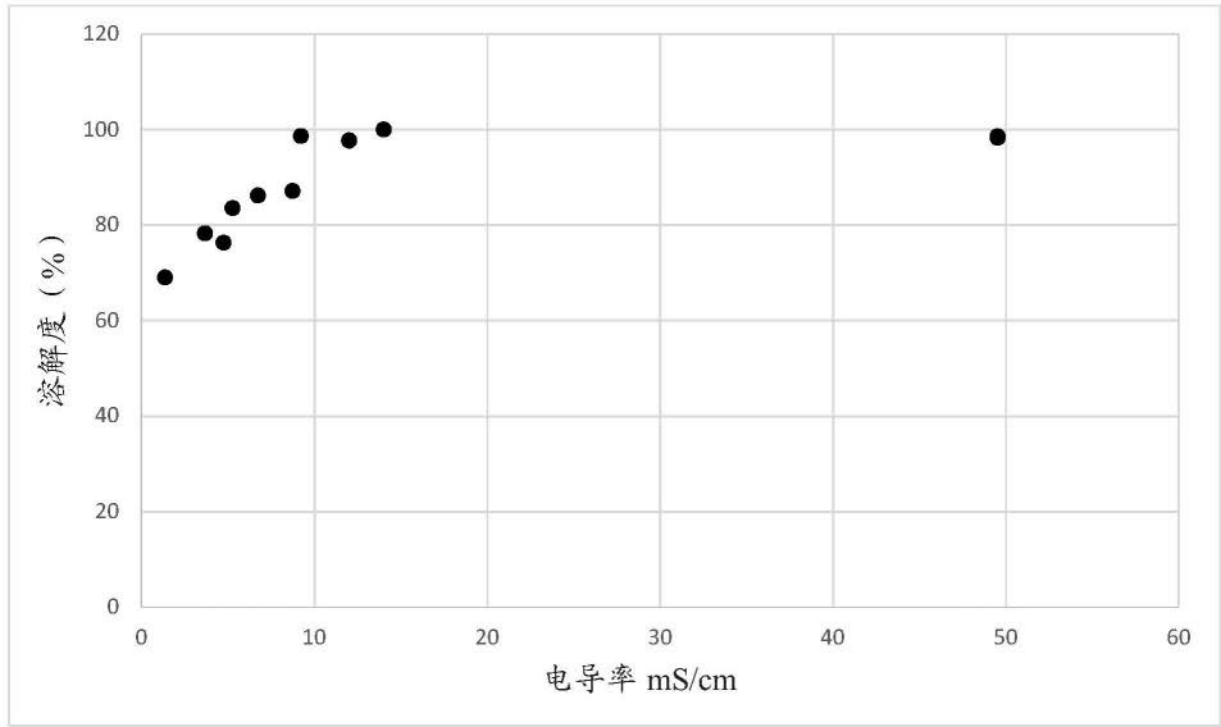


图5

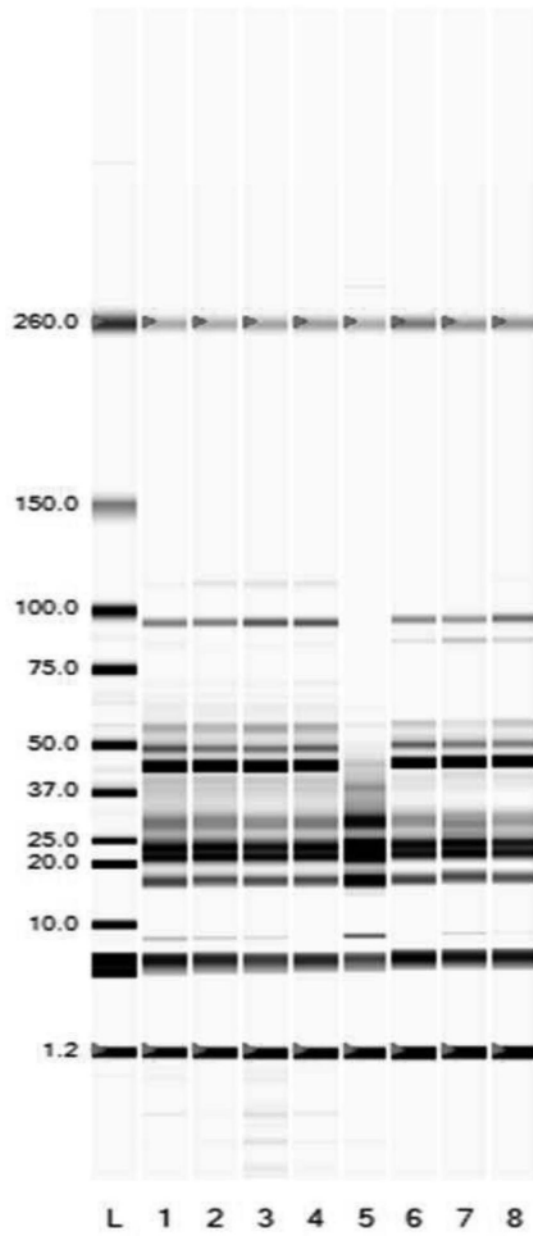


图6