



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114364688 A

(43) 申请公布日 2022.04.15

(21) 申请号 202080061713.2

(22) 申请日 2020.07.10

(30) 优先权数据

62/872,917 2019.07.11 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.03.02

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/041525 2020.07.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/007484 EN 2021.01.14

(71) 申请人 浮萍蛋白食品公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·马登斯 C·弗洛里斯

E·雷诺索·莫雷诺

R·范·德·莫伦

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/32 (2006.01)

权利要求书6页 说明书32页 附图13页

(54) 发明名称

从植物材料分离高纯度蛋白质制品的工艺
及其产品

(57) 摘要

提供了用于从植物材料制备和纯化蛋白质的工艺以及包含所述蛋白质的组合物和用途。

1. 一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
 - a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的所述植物材料;
 - b) 裂解所述植物材料;
 - c) 将所述裂解的植物材料分离成固相和液相,其中所述液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
 - d) 通过如下方式使所述液相中的叶绿素凝结:将其在不超过约30分钟内加热至第一设定温度,然后将其在不超过约30分钟内冷却至第二设定温度,其中所述冷却在所述液相达到所述第一设定温度时开始;
 - e) 使d) 中的所述液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使所述液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至所述吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
 - f) 将e) 中的所述絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
 - g) 过滤f) 中的所述液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。
2. 一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
 - a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的所述植物材料;
 - b) 裂解所述植物材料;
 - c) 将所述裂解的植物材料分离成固相和液相,其中所述液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
 - d) 通过添加一种或多种盐使所述液相中的所述叶绿素凝结;
 - e) 使d) 中的所述液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使所述液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至所述吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
 - f) 将e) 中的所述絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
 - g) 过滤f) 中的所述液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。
3. 一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
 - a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的所述植物材料;
 - b) 裂解所述植物材料;
 - c) 将所述裂解的植物材料分离成固相和液相,其中所述液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
 - d) 使用基于聚合物的促凝剂使所述液相中的所述叶绿素凝结;
 - e) 使d) 中的所述液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使所述液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至所述吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
 - f) 将e) 中的所述絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
 - g) 过滤f) 中的所述液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。
4. 一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
 - a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的所述植物材料;
 - b) 裂解所述植物材料;
 - c) 将所述裂解的植物材料分离成固相和液相,其中所述液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
 - d) 通过电凝法使所述液相中的所述叶绿素凝结;
 - e) 使d) 中的所述液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使所述液相中的叶绿素

絮凝和/或吸附至所述吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;

f) 将e)中的所述絮凝的混合物分离成固相和液相;以及

g) 过滤f)中的所述液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料在a)之前被清洗。

6. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述还原剂是2-巯基乙醇(BME)、2-巯基乙醇盐酸盐、偏亚硫酸氢钠、盐酸半胱氨酸、二硫苏糖醇(DTT)、谷胱甘肽、半胱氨酸、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、亚铁离子、初生态氢、钠汞齐、草酸、甲酸、镁、锰、磷酸、钾或钠。

7. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述还原剂是亚硫酸盐。

8. 如权利要求7所述的工艺,其中所述亚硫酸盐是亚硫酸钠、亚硫酸镁或偏亚硫酸氢钠。

9. 如权利要求7所述的工艺,其中所述亚硫酸盐是亚硫酸氢钠。

10. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述溶液含有一种或多种缓冲剂。

11. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述溶液含有一种或多种螯合剂。

12. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述溶液含有一种或多种蛋白酶抑制剂。

13. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述溶液含有一种或多种缓冲剂、一种或多种螯合剂和/或一种或多种蛋白酶抑制剂。

14. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述溶液的pH值为约pH 5.0至约pH 9.0。

15. 如权利要求14所述的工艺,其中所述溶液的所述pH值为约pH 6.0至约pH 7.6。

16. 如权利要求15所述的工艺,其中所述溶液的所述pH值为约6.8。

17. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述植物材料和溶液的比例为约6:1。

18. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述植物材料和溶液的比例为约3:1。

19. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述植物材料和溶液的比例为约2:1。

20. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的所述植物材料和溶液的比例为约1:1。

21. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料的所述裂解包括向所述裂解液和/或滤液中加入一种或多种二价离子以及/或者向所述裂解液和/或滤液中加入壳聚糖。

22. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料的所述裂解包括向所述裂解液中加入钙离子。

23. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料的所述裂解包括向所述裂解液中加入氯化钙。

24. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料被化学、机械和/或酶促裂

解。

25. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料被化学裂解。

26. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用一种或多种洗涤剂进行化学裂解的。

27. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用CHAPS进行化学裂解的。

28. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用一种或多种酶进行酶促裂解的。

29. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用纤维素酶或果胶酶进行裂解的。

30. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料被机械裂解。

31. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用共混机进行机械裂解的。

32. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用研磨机、匀浆器、微流化器、机械压力或Stephan切割器进行机械裂解的。

33. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用压机、超声波仪、粉碎机,使用脉冲电场,使用氮爆搅动,使用超声能量或通过冷冻进行机械裂解的。

34. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用至少一种研磨机进行机械裂解的。

35. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述植物材料是使用至少两种不同类型的研磨机进行机械裂解的。

36. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的所述分离利用螺杆压机、倾析器或离心机来执行。

37. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的所述分离利用碟片离心机、连续离心机或篮式离心机来执行。

38. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的所述分离利用过滤来执行。

39. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的所述分离利用压机来执行。

40. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的所述分离利用过滤来执行。

41. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的所述分离利用重力沉降来执行。

42. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的所述分离利用过筛来执行。

43. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的所述第一设定温度不超过约80℃。

44. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的所述第一设定温度不超过约65℃。

45. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的所述第一设定温度不超过约55℃。

46. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的所述第一设定温度不超过约50℃。

47. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的所述第二设定温度不超过约25℃。

48. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的所述第二设定温度不超过约15℃。

49. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的所述第二设定温度不超过约10℃。

50. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的加热至第一设定温度耗时不超过约15min。

51. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的加热至第一设定温度耗时不超过约5min。

52. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的冷却至第二设定温度耗时不超过约15min。
53. 如权利要求1所述的工艺,其中d)中的冷却至第二设定温度耗时不超过约5min。
54. 如权利要求2所述的工艺,其中d)中的所述一种或多种盐包括一种或多种钙盐、一种或多种镁盐、一种或多种铍盐、一种或多种锌盐、一种或多种镉盐、一种或多种铜盐、一种或多种铁盐、一种或多种钴盐、一种或多种锡盐、一种或多种锑盐、一种或多种钽盐和/或一种或多种镭盐。
55. 如权利要求2所述的工艺,其中d)中的所述一种或多种盐包括磷酸钾和/或氯化钙。
56. 如权利要求2所述的工艺,其中d)中的所述一种或多种盐是以5mM至2M的浓度添加。
57. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述絮凝剂是烷基胺环氧氯丙烷、聚二甲基二烯丙基氯化铵、多糖、多胺、淀粉、硫酸铝、明矾、聚丙烯酰胺、polyacromide或聚乙烯亚胺。
58. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述絮凝剂是壳聚糖。
59. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述絮凝剂是活化壳聚糖。
60. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述絮凝剂是1-20%w/w呈溶液形式的活化壳聚糖。
61. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中e)中的所述吸附剂是树脂。
62. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中e)中的所述吸附剂是活性炭、活化木炭或活化煤。
63. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中3)的所述吸附剂是活性炭,所述活性炭的表面积超过250m²/g、重量平均直径为1-1000μm、碘值为400-1,400mg/g、糖蜜值在100-550范围内并且/或者亚甲蓝吸附值为至少10g/100g。
64. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的所述分离是在不超过25℃的温度下执行。
65. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的所述分离是在不超过15℃的温度下执行。
66. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的所述分离是在不超过10℃的温度下执行。
67. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的所述分离利用过滤来执行。
68. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的所述分离利用压机、利用重力沉降或者通过过筛来执行。
69. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的所述分离利用离心机或倾析器或通过微孔过滤来执行。
70. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中除e)外,所述工艺的所有步骤都是在不超过25℃的温度下执行。
71. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中除e)外,所述工艺的所有步骤都是在不超过15℃的温度下执行。
72. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中除e)外,所述工艺的所有步骤都是在不超过10℃的温度下执行。
73. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的所述过滤利用膜式过滤器来执

行。

74. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的所述过滤利用0.7 μ m膜式过滤器来执行。

75. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的所述过滤利用0.2 μ m膜式过滤器来执行。

76. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的所述过滤利用硅藻土和/或活性炭来执行。

77. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的所述过滤利用最高约10%活性炭来执行。

78. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的所述过滤利用最高约2%活性炭来执行。

79. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的所述过滤利用0.2 μ m膜式过滤器和约2%活性炭来执行。

80. 如权利要求73-79中任一项所述的工艺,其进一步包括在g)之后将g)中的所述滤液经0.2 μ m膜式过滤器过滤。

81. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中一个或多个液相和/或一个或多个滤液包含一种或多种抑泡剂和/或一种或多种消泡剂。

82. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中一个或多个液相和/或一个或多个滤液被过滤以除去小固体和/或微生物。

83. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中一个或多个液相和/或一个或多个滤液被灭菌。

84. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其进一步包括浓缩所述滤液。

85. 如权利要求84所述的工艺,其中浓缩所述滤液是通过超滤来执行。

86. 如权利要求85所述的工艺,其中所述超滤是经聚醚砜、聚丙烯、聚偏二氟乙烯、聚丙烯腈、醋酸纤维素或聚砜进行。

87. 如权利要求85所述的工艺,其中所述超滤使用截止值不超过100kDa的超滤过滤器来执行。

88. 如权利要求85所述的工艺,其中所述超滤使用截止值不超过50kDa的超滤过滤器来执行。

89. 如权利要求85所述的工艺,其中所述超滤使用截止值不超过10kDa的超滤过滤器来执行。

90. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质的所述收率为步骤c)中的所述液相中所述可溶性蛋白质的至少约10%。

91. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质的所述收率为步骤c)中的所述液相中所述可溶性蛋白质的至少约20%。

92. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质的所述收率为步骤c)中的所述液相中所述可溶性蛋白质的至少约25%。

93. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质的所述纯度为至少约40%。

94. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质的所述纯度为至少约60%。

95. 如权利要求1-4中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质的所述纯度为至少约80%。

96. 如权利要求1-95中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质制品中叶绿素与蛋白质的重量比低于约1:1000、约1:1500、约1:2000或约1:2500。

97. 如权利要求1-96中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质制品中赋予一种或多种感官特性或与一种或多种感官特性相关的一种或多种剂相对于所述源植物材料被减少或去除。

98. 如权利要求1-96中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质制品中赋予一种或多种感官特性或与一种或多种感官特性相关的一种或多种剂相对于所述源植物材料被减少了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

99. 如权利要求1-96中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质制品基本上是无气味的。

100. 如权利要求1-96中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质制品是无气味的。

101. 如权利要求1-100中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质制品基本上是中性味道的。

102. 如权利要求1-100中任一项所述的工艺,其中所述纯化蛋白质制品是中性味道的。

103. 如权利要求1-102中任一项所述的工艺,其中所述蛋白质是RuBisCo。

104. 如权利要求1-103中任一项所述的工艺,其中所述植物材料来自浮萍属。

105. 如权利要求1-103中任一项所述的工艺,其中所述植物材料来自浮萍亚科。

106. 一种通过权利要求1-105中任一项所述的工艺制备的产品。

107. 一种包含来自植物材料的纯化蛋白质制品的食品,其中所述蛋白质制品含有不超过80%杂质。

108. 如权利要求107所述的食品,其中所述蛋白质制品包含RuBisCo。

109. 如权利要求107或108所述的食品,其中所述植物材料来自浮萍属。

110. 如权利要求107或108所述的食品,其中所述植物材料来自浮萍亚科。

从植物材料分离高纯度蛋白质制品的工艺及其产品

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年7月11日提交的美国临时申请第62/872,917号的权益,其内容已通过引用方式整体并入。

技术领域

[0003] 公开了从植物材料制备、提取和纯化蛋白质制品的工艺以及从此类工艺制备的产品。

背景技术

[0004] 用于人类消费的肉的生产具有较大的不良环境影响。该行业已知是最大的温室气体排放源之一,也是水污染和生物多样性丧失的主要原因。Steinfeld等人,Livestock's Long Shadow:Environmental Issues and Options, (2006) Food and Agriculture Organization of the United Nations; Machovina等人, Science of the Total Environment, (2016) 536:419-431; Godfray等人, Science, (2018) 361 (6399) :eaam5324。由于世界肉类消耗因人口、财富和生活方式改变而增加,因此越来越需要环境友好的肉类替代品。Erb等人, Nat. Comms., (2016) 7:11382。

[0005] 饮食中肉类的替代需要能够大规模可持续生产的基于植物的高蛋白替代品。蛋白质核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧合酶("RuBisCo")占植物中总蛋白的最高50%。它是固碳的第一个重要步骤中涉及的酶,固碳是大气中的二氧化碳被植物和其他光合生物转化为诸如葡萄糖等富含能量的分子的过程。由于它在植物中的丰度,因此可作为蛋白质的替代来源用于食品生产。纯化的RuBisCo通常为无味、无气味的白色粉末。

[0006] 浮萍(浮萍亚科(Lemnoideae),浮萍(Lemna)属)是全球最小的有花植物。尽管它体型较小,但它具有快速生长从而使其生物量在约16至48小时内翻倍的能力,这取决于条件。Mestameyer等人, Spirodela punctata Aquatic Botany, (1984) 19:157-70。浮萍具有高蛋白质含量(其干重的约30-35%为蛋白质),因此已被用作动物饲料。所有这些特性都使浮萍成为一种用于大规模生产基于植物的食品用蛋白质的有吸引力的候选者。

[0007] 蛋白质形成乳液、凝胶和稳定泡沫的能力在多种食品的生产中也很重要,形成了食物产品质地的基础。例如,具有均匀分布的小气泡的泡沫可赋予食品香醇度(body)、光滑度和光亮度。蛋白质制品形成泡沫的能力与其纯度相关,并且可能需要至少约80%的纯度来形成稳定泡沫。类似地,由蛋白质制成的凝胶会产生具有不同流变特性和外观的食品。蛋白质的胶凝能力可通过形成凝胶所需的蛋白量进行测量。因此,期望有高纯度、发泡能力、泡沫稳定性和凝胶能力的蛋白质制品用于食品。

[0008] 目前需要经济的工艺从植物例如浮萍亚科或浮萍属来纯化和提取蛋白质。本文公开了能够生产可灵活地被配制成大部分食品产品的纯化蛋白质制品的工艺。

发明内容

[0009] 本公开提供了从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:

[0010] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;

[0011] b) 裂解植物材料;

[0012] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;

[0013] d) 通过如下方式使液相中的叶绿素凝结:将其在不超过约30分钟内加热至第一设定温度,然后将其在不超过约30分钟内冷却至第二设定温度,其中冷却在液相达到第一设定温度时开始。

[0014] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;

[0015] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及

[0016] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。

[0017] 本公开还提供了从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:

[0018] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;

[0019] b) 裂解植物材料;

[0020] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;

[0021] d) 通过添加一种或多种盐使液相中的叶绿素凝结;

[0022] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;

[0023] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及

[0024] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。

[0025] 本公开还提供了从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:

[0026] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;

[0027] b) 裂解植物材料;

[0028] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;

[0029] d) 通过添加一种或多种盐使液相中的叶绿素凝结;

[0030] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;

[0031] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及

[0032] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。

[0033] 本公开还提供了从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:

[0034] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;

[0035] b) 裂解植物材料;

[0036] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;

[0037] d) 使用基于聚合物的促凝剂(coagulant)使液相中的叶绿素凝结;

[0038] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;

[0039] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及

[0040] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。

- [0041] 本公开还提供了从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
- [0042] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;
- [0043] b) 裂解植物材料;
- [0044] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
- [0045] d) 通过电凝法使液相中的叶绿素凝结;
- [0046] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
- [0047] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
- [0048] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。
- [0049] 在一些方面,本公开涉及以下实施方案:
- [0050] 1. 一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
- [0051] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;
- [0052] b) 裂解植物材料;
- [0053] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
- [0054] d) 通过如下方式使液相中的叶绿素凝结:将其在不超过约30分钟内加热至第一设定温度,然后将其在不超过约30分钟内冷却至第二设定温度,其中冷却在液相达到第一设定温度时开始;
- [0055] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
- [0056] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
- [0057] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。
- [0058] 2. 一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
- [0059] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;
- [0060] b) 裂解植物材料;
- [0061] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
- [0062] d) 通过添加一种或多种盐使液相中的叶绿素凝结;
- [0063] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
- [0064] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
- [0065] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。
- [0066] 3. 一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
- [0067] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;
- [0068] b) 裂解植物材料;
- [0069] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
- [0070] d) 使用基于聚合物的促凝剂使液相中的叶绿素凝结;
- [0071] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
- [0072] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
- [0073] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。

- [0074] 4.一种从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺,其包括:
- [0075] a) 提供在包含还原剂的缓冲溶液中的植物材料;
- [0076] b) 裂解植物材料;
- [0077] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;
- [0078] d) 通过电凝法使液相中的叶绿素凝结;
- [0079] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;
- [0080] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及
- [0081] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。
- [0082] 5.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料在a)之前被清洗。
- [0083] 6.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中还原剂是2-巯基乙醇(BME)、2-巯基乙胺盐酸盐、偏亚硫酸氢钠、盐酸半胱氨酸、二硫苏糖醇(DTT)、谷胱甘肽、半胱氨酸、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、亚铁离子、初生态氢、钠汞齐、草酸、甲酸、镁、锰、磷酸、钾或钠。
- [0084] 7.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中还原剂是亚硫酸盐。
- [0085] 8.如实施方案7所述的工艺,其中亚硫酸盐是亚硫酸钠、亚硫酸镁或偏亚硫酸氢钠。
- [0086] 9.如实施方案7所述的工艺,其中亚硫酸盐是亚硫酸氢钠。
- [0087] 10.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的溶液含有一种或多种缓冲剂。
- [0088] 11.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的溶液含有一种或多种螯合剂。
- [0089] 12.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的溶液含有一种或多种蛋白酶抑制剂。
- [0090] 13.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的溶液含有一种或多种缓冲剂、一种或多种螯合剂和/或一种或多种蛋白酶抑制剂。
- [0091] 14.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的溶液的pH值为约pH 5.0至约pH 9.0。
- [0092] 15.如实施方案14所述的工艺,其中所述溶液的pH值为约pH 6.0至约pH 7.6。
- [0093] 16.如实施方案15所述的工艺,其中所述溶液的pH值为约6.8。
- [0094] 17.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的植物材料和溶液的比例为约6:1。
- [0095] 18.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的植物材料和溶液的比例为约3:1。
- [0096] 19.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的植物材料和溶液的比例为约2:1。
- [0097] 20.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中a)中的植物材料和溶液的比例为约1:1。
- [0098] 21.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料的裂解包括向裂解液和/或滤液中加入一种或多种二价离子以及/或者向裂解液和/或滤液中加入壳聚糖。

- [0099] 22.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料的裂解包括向裂解液中加入钙离子。
- [0100] 23.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料的裂解包括向裂解液中加入氯化钙。
- [0101] 24.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料被化学、机械和/或酶促裂解。
- [0102] 25.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料被化学裂解。
- [0103] 26.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用一种或多种洗涤剂进行化学裂解的。
- [0104] 27.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用CHAPS进行化学裂解的。
- [0105] 28.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用一种或多种酶进行酶促裂解的。
- [0106] 29.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用纤维素酶或果胶酶进行裂解的。
- [0107] 30.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料被机械裂解。
- [0108] 31.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用共混机进行机械裂解的。
- [0109] 32.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用研磨机、匀浆器、微流化器、机械压力或Stephan切割器进行机械裂解的。
- [0110] 33.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用压机、超声波仪、粉碎机,使用脉冲电场,使用氮爆搅动,使用超声能量或通过冷冻进行机械裂解的。
- [0111] 34.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用至少一种研磨机进行机械裂解的。
- [0112] 35.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中植物材料是使用至少两种不同类型的研磨机进行机械裂解的。
- [0113] 36.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的分离利用螺杆压机、倾析器或离心机来执行。
- [0114] 37.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的分离利用碟片离心机、连续离心机或篮式离心机来执行。
- [0115] 38.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的分离利用过滤来执行。
- [0116] 39.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的分离利用压机来执行。
- [0117] 40.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的分离利用过滤来执行。
- [0118] 41.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的分离利用重力沉降来执行。
- [0119] 42.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中c)中的分离利用过筛来执行。
- [0120] 43.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的第一设定温度不超过约80℃。
- [0121] 44.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的第一设定温度不超过约65℃。
- [0122] 45.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的第一设定温度不超过约55℃。
- [0123] 46.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的第一设定温度不超过约50℃。

- [0124] 47.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的第二设定温度不超过约25℃。
- [0125] 48.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的第二设定温度不超过约15℃。
- [0126] 49.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的第二设定温度不超过约10℃。
- [0127] 50.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的加热至第一设定温度耗时不超过约15min。
- [0128] 51.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的加热至第一设定温度耗时不超过约5min。
- [0129] 52.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的冷却至第二设定温度耗时不超过约15min。
- [0130] 53.如实施方案1所述的工艺,其中d)中的冷却至第二设定温度耗时不超过约5min。
- [0131] 54.如实施方案2所述的工艺,其中d)中的一种或多种盐包括一种或多种钙盐、一种或多种镁盐、一种或多种铍盐、一种或多种锌盐、一种或多种镉盐、一种或多种铜盐、一种或多种铁盐、一种或多种钴盐、一种或多种锡盐、一种或多种锑盐、一种或多种钡盐和/或一种或多种镭盐。
- [0132] 55.如实施方案2所述的工艺,其中d)中的一种或多种盐包括磷酸钾和/或氯化钙。
- [0133] 56.如实施方案2所述的工艺,其中d)中的一种或多种盐是以5mM至2M的浓度添加。
- [0134] 57.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中絮凝剂是烷基胺环氧氯丙烷、聚二甲基二烯丙基氯化铵、多糖、多胺、淀粉、硫酸铝、明矾、聚丙烯酰胺、polyacromide或聚乙烯亚胺。
- [0135] 58.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中絮凝剂是壳聚糖。
- [0136] 59.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中絮凝剂是活化壳聚糖。
- [0137] 60.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中絮凝剂是1-20%w/w呈溶液形式的活化壳聚糖。
- [0138] 61.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中e)中的吸附剂是树脂。
- [0139] 62.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中e)中的吸附剂是活化的碳(activated carbon)、活化木炭(activated charcoal)或活化煤(activated coal)。
- [0140] 63.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中3)的吸附剂是活化的碳,所述活化的碳的表面积超过250m²/g、重量平均直径为1-1000μm、碘值为400-1,400mg/g、糖蜜值在100-550范围内并且/或者亚甲蓝吸附值为至少10g/100g。
- [0141] 64.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的分离是在不超过25℃的温度下执行。
- [0142] 65.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的分离是在不超过15℃的温度下执行。
- [0143] 66.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的分离是在不超过10℃的温度下执行。
- [0144] 67.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的分离利用过滤来执行。
- [0145] 68.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的分离利用压机、利用重力沉降或者通过过筛来执行。

- [0146] 69.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中f)中的分离利用离心机或倾析器或通过微孔过滤来执行。
- [0147] 70.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中除e)外,该工艺的所有步骤都是在不超过25℃的温度下执行。
- [0148] 71.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中除e)外,该工艺的所有步骤都是在不超过15℃的温度下执行。
- [0149] 72.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中除e)外,该工艺的所有步骤都是在不超过10℃的温度下执行。
- [0150] 73.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的过滤利用膜式过滤器来执行。
- [0151] 74.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的过滤利用0.7 μ m膜式过滤器来执行。
- [0152] 75.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的过滤利用0.2 μ m膜式过滤器来执行。
- [0153] 76.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的过滤利用硅藻土和/或活性炭来执行。
- [0154] 77.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的过滤利用最高约10%活性炭来执行。
- [0155] 78.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的过滤利用最高约2%活性炭来执行。
- [0156] 79.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中g)中的过滤利用0.2 μ m膜式过滤器和约2%活性炭来执行。
- [0157] 80.如实施方案73-79中任一项所述的工艺,其进一步包括在g)之后将g)中的滤液经0.2 μ m膜式过滤器过滤。
- [0158] 81.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中一个或多个液相和/或一个或多个滤液包含一种或多种抑泡剂和/或一种或多种消泡剂。
- [0159] 82.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中一个或多个液相和/或一个或多个滤液被过滤以除去小固体和/或微生物。
- [0160] 83.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中一个或多个液相和/或一个或多个滤液被灭菌。
- [0161] 84.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其进一步包括浓缩滤液。
- [0162] 85.如实施方案84所述的工艺,其中浓缩滤液是通过超滤来执行。
- [0163] 86.如实施方案85所述的工艺,其中超滤是经聚醚砜、聚丙烯、聚偏二氟乙烯、聚丙烯腈、醋酸纤维素或聚砜进行。
- [0164] 87.如实施方案85所述的工艺,其中超滤使用截止值不超过100kDa的超滤过滤器来执行。
- [0165] 88.如实施方案85所述的工艺,其中超滤使用截止值不超过50kDa的超滤过滤器来执行。
- [0166] 89.如实施方案85所述的工艺,其中超滤使用截止值不超过10kDa的超滤过滤器来

执行。

[0167] 90.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质的收率为步骤c)中的液相中可溶性蛋白质的至少约10%。

[0168] 91.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质的收率为步骤c)中的液相中可溶性蛋白质的至少约20%。

[0169] 92.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质的收率为步骤c)中的液相中可溶性蛋白质的至少约25%。

[0170] 93.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质的纯度为至少约40%。

[0171] 94.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质的纯度为至少约60%。

[0172] 95.如实施方案1-4中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质的纯度为至少约80%。

[0173] 96.如实施方案1-95中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质制品中叶绿素与蛋白质的重量比低于约1:1000、约1:1500、约1:2000或约1:2500。

[0174] 97.如实施方案1-96中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质制品中赋予一种或多种感官特性或与一种或多种感官特性相关的一种或多种剂相对于源植物材料被减少或去除。

[0175] 98.如实施方案1-96中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质制品中赋予一种或多种感官特性或与一种或多种感官特性相关的一种或多种剂相对于源植物材料被减少了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。

[0176] 99.如实施方案1-96中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质制品基本上是无气味的。

[0177] 100.如实施方案1-96中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质制品是无气味的。

[0178] 101.如实施方案1-100中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质制品基本上是中性味道的。

[0179] 102.如实施方案1-100中任一项所述的工艺,其中纯化蛋白质制品是中性味道的。

[0180] 103.如实施方案1-102中任一项所述的工艺,其中蛋白质是RuBisCo。

[0181] 104.如实施方案1-103中任一项所述的工艺,其中植物材料来自浮萍属。

[0182] 105.如实施方案1-103中任一项所述的工艺,其中植物材料来自浮萍亚科。

[0183] 106.一种通过实施方案1-105中任一项所述的工艺制备的产品。

[0184] 107.一种包含来自植物材料的纯化蛋白质制品的食品,其中蛋白质制品含有不超过80%杂质。

[0185] 108.如实施方案107所述的食品,其中蛋白质制品包含RuBisCo。

[0186] 109.如实施方案107或108所述的食品,其中植物材料来自浮萍属。

[0187] 110.如实施方案107或108所述的食品,其中植物材料来自浮萍亚科。

[0188] 在本公开的一些方面,植物材料是在工艺开始前被清洗。在一些实施方案中,a)中的还原剂是2-巯基乙醇(BME)、2-巯基乙胺盐酸盐、偏亚硫酸氢钠、盐酸半胱氨酸、二硫苏糖醇(DTT)、谷胱甘肽、半胱氨酸、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、亚铁离子、初生态氢、钠汞齐、草酸、甲酸、镁、锰、磷酸、钾以及钠。在一些实施方案中,还原剂是亚硫酸盐。在一些实施方案中,亚硫酸盐是亚硫酸钠、亚硫酸镁或偏亚硫酸氢钠。在一些实施方案中,亚硫酸盐是亚硫酸氢

钠。

[0189] 在一些实施方案中,a)中溶液的pH值是约pH 5.0至约pH 9.0。在一些实施方案中,溶液的pH值是约pH 6.0至约pH 7.6。在一些实施方案中,溶液的pH值是约6.8。

[0190] 在一些实施方案中,a)中的植物材料和溶液的比例为约6:1。在一些实施方案中,a)中的植物材料和溶液的比例为约3:1。在一些实施方案中,a)中的植物材料和溶液的比例为约2:1。在一些实施方案中,a)中的植物材料和溶液的比例为约1:1。

[0191] 在本公开的一些方面,植物材料被机械裂解。在一些实施方案中,植物材料是使用共混机进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用研磨机、匀浆器、微流化器、机械压力或Stephan切割器进行机械裂解的。

[0192] 在本公开的一些方面,c)中的分离利用螺杆压机、倾析器或离心机来执行。

[0193] 在本公开的一些方面,d)中的第一设定温度不超过约80℃。在本公开的一些方面,d)中的第一设定温度不超过约65℃。在一些实施方案中,d)中的第一设定温度不超过约55℃。在一些实施方案中,d)中的第一设定温度不超过约50℃。在一些实施方案中,d)中的第二设定温度不超过约25℃。在一些实施方案中,d)中的第二设定温度不超过约15℃。在一些实施方案中,d)中的第二设定温度不超过约10℃。在一些实施方案中,d)中的加热至第一设定温度耗时不超过约1min。在一些实施方案中,d)中的加热至第一设定温度耗时不超过约5min。在一些实施方案中,d)中的冷却至第二设定温度耗时不超过约15min。在一些实施方案中,d)中的冷却至第二设定温度耗时不超过约5min。

[0194] 在本公开的一些方面,d)中的一种或多种盐包括磷酸钾和/或氯化钙。在本公开的一些方面,d)中的一种或多种盐是以5mM至2M的浓度添加。

[0195] 在本公开的一些方面,絮凝剂是壳聚糖。在本公开的一些方面,絮凝剂是活化壳聚糖。在一些实施方案中,絮凝剂是1-20%w/v呈溶液形式的活化壳聚糖。在一些实施方案中,e)中的吸附剂是活性炭、活化木炭或活化煤。在一些实施方案中,吸附剂是疏水吸附剂。

[0196] 在本公开的一些方面,f)中的分离是在不超过25℃的温度下执行。在一些实施方案中,f)中的分离是在不超过15℃的温度下执行。在一些实施方案中,f)中的分离是在不超过10℃的温度下执行。在一些实施方案中,f)中的分离利用离心机或倾析器或通过微孔过滤来执行。

[0197] 在本公开的一些方面,除e)外,该工艺的所有步骤都是在不超过25℃的温度下执行。在一些实施方案中,除e)外,该工艺的所有步骤都是在不超过15℃的温度下执行。在一些实施方案中,除e)外,该工艺的所有步骤都是在不超过10℃的温度下执行。

[0198] 在本公开的一些方面,g)中的过滤利用膜式过滤器来执行。在一些实施方案中,g)中的过滤利用0.7μm膜式过滤器来执行。在一些实施方案中,g)中的过滤利用0.2μm膜式过滤器来执行。在一些实施方案中,其中g)中的过滤利用硅藻土和/或活性炭来执行。在一些实施方案中,g)中的过滤利用最高约10%活性炭来执行。在一些实施方案中,g)中的过滤利用最高约2%活性炭来执行。在一些实施方案中,g)中的过滤利用0.2μm膜式过滤器和2%活性炭来执行。在一些实施方案中,该工艺进一步包括在g)之后将g)中的滤液经0.2μm膜式过滤器过滤。在一些实施方案中,该工艺进一步包括浓缩滤液。在一些实施方案中,浓缩滤液是通过渗滤来执行。在一些实施方案中,浓缩滤液是通过超滤来执行。在一些实施方案中,超滤使用截止值不超过100kDa的超滤过滤器来执行。在一些实施方案中,超滤使用截止值

不超过50kDa的超滤过滤器来执行。在一些实施方案中,超滤使用截止值不超过10kDa的超滤过滤器来执行。

[0199] 在本公开的一些方面,纯化蛋白质的收率为步骤c)中的液相中可溶性蛋白质的至少约10%。在一些实施方案中,纯化蛋白质的收率为步骤c)中的液相中可溶性蛋白质的至少约20%。在一些实施方案中,纯化蛋白质的收率为步骤c)中的液相中可溶性蛋白质的至少约25%。在一些实施方案中,纯化蛋白质的纯度为至少约40%。在一些实施方案中,纯化蛋白质的纯度为至少约60%。在一些实施方案中,纯化蛋白质的纯度为至少约80%。

[0200] 在本公开的一些方面,所述蛋白质是RuBisCo。在一些实施方案中,植物材料来自浮萍属。在一些实施方案中,植物材料来自浮萍亚科。

[0201] 本文还公开了通过所公开的工艺制备的产品。

[0202] 本文还公开了包含来自植物材料的纯化蛋白质制品的食品,其中蛋白质制品含有不超过80%的杂质。

附图说明

[0203] 图1:所述工艺的一个实施方案的流程图。

[0204] 图2:所述工艺的第二个实施方案的流程图。

[0205] 图3:所述工艺的第三个实施方案的流程图。

[0206] 图4:所述工艺的第四个实施方案的流程图。

[0207] 图5:微孔过滤后实施例5的馏分1、2、3和4的描述。

[0208] 图6:微孔过滤后实施例5的馏分4、3、2和1的描述。

[0209] 图7A:实施例5的馏分的描述。

[0210] 图7B:实施例5的馏分的描述。

[0211] 图8:添加氯化钙和磷酸盐并进行台架离心后实施例6的馏分样品的描述。

[0212] 图9:去除活性炭和壳聚糖后实施例6的馏分1-6样品的描述。

[0213] 图10:实施例6的馏分样品的SDS-PAGE考马斯染色分析结果的描述。

[0214] 图11:实施例7的各种样品的SDS-PAGE凝胶的描述。

[0215] 图12:去除活性炭和壳聚糖后实施例7的馏分的描述。

[0216] 图13:实施例8的各种样品的SDS-PAGE凝胶的描述。

[0217] 图14:实施例9的各种样品的SDS-PAGE凝胶的描述。

[0218] 图15:微孔过滤后实施例10的馏分1-5的描述。

[0219] 图16:最终蛋白质产品和蛋白质标准品的色谱图的描述。

[0220] 图17:最终植物蛋白质产品的SDS-PAGE凝胶的描述。

[0221] 图18:实施例16的材料的吸收光谱的描述。

具体实施方式

[0222] 所公开的工艺和组合物可通过参考以下结合附图进行的详细描述更容易地理解,附图构成了本公开的一部分。

[0223] 在本文中,“描述(description)”是指工艺和通过工艺制备的组合物。当本公开公开或要求保护与组合物相关的特征或实施方案时,此类特征或实施方案同等地适用于制备

该组合物的工艺。同样,当本公开公开或要求保护与制备组合物的工艺相关的特征或实施方案时,此类特征或实施方案同等地适用于该组合物。当表述多个值时,它包括使用该范围内任何特定值的实施方案。进一步地,范围内所陈述的值的提及包括该范围内的每个值。当利用先行词“(大)约”将值表示为近似值时,应理解该具体值形成另一个实施方案。“或(者)”的使用将意味着“和/或”,除非其使用的特殊背景另有指示。本文引用的所有参考文献均通过引用方式以其整体并入本文用于任何目的。当参考文献和说明书冲突时,以说明书为准。应当认识到,为清楚起见,在本文中的独立实施方案的上下文中公开的所公开的工艺和组合物的某些特征也可以在单个实施方案中以组合提供。相反地,为简洁起见,在单个实施方案的上下文中公开的所公开的工艺和组合物的各种特征也可以单独或以任何子组合提供。

[0224] 如本文所用,单数形式“一种/个(a)”、“一种/个(an)”和“该/所述(the)”包括复数形式,除非上下文另有明确指示。术语“(大)约(about)”或“近似(approximately)”在数值和范围的上下文中使用时是指近似或接近列举值或范围的值或范围,使得实施方案可按照预期执行最多约加或减10%,如本领域技术人员从本文中所含教示显而易见的。在一些实施方案中,(大)约意指数量的加或减10%。

[0225] 本文中公开了从植物材料制备蛋白质制品的工艺。如本文所用,术语“植物”是指属于植物界的有机体。适合在所公开的工艺中使用的植物的实例包括树、草本植物、灌木、草、藤蔓、蕨类、藓类和绿藻。术语“植物材料”是指源自植物的任何生物质。植物材料可源自植物的任何部分,例如茎、根、果实、叶或种子。在一些实施方案中,植物材料源自叶。在一些实施方案中,植物材料源自茎。植物材料还可以从一个或多个植物物种获得。例如,在一些实施方案中,植物材料可源自浮萍、海藻、糖用甜菜叶、菠菜、甘蓝、甜菜、牛皮菜、糖用甜菜、海甜菜、Mangel甜菜、大豆或烟草。在一些实施方案中,植物材料源自浮萍。在一些实施方案中,植物材料源自浮萍属。在一些实施方案中,植物材料源自浮萍亚科。

[0226] 如本文所用,术语“蛋白质”是指由被肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质通常含有至少两种氨基酸或氨基酸变体,并且对能够构成蛋白质序列的氨基酸的最大数量没有限制。术语“蛋白质制品”是指蛋白质的分离物,其中蛋白质基本上已与混合物的非蛋白质组分分离。蛋白质制品的“纯度”是指相对于制品总量的蛋白质的量。在一些实施方案中,蛋白质制品的纯度被表示为占总干质量的百分比。在一些实施方案中,蛋白质制品包含至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%的蛋白质。在一些实施方案中,蛋白质制品的纯度为至少约40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%或99%蛋白质。蛋白质制品可包含一种或多种类型的蛋白质,并且可包含不同大小的相同蛋白质。例如,在一些实施方案中,蛋白质制品可包含麻仁球蛋白、谷蛋白、豆球蛋白或豌豆球蛋白。在一些实施方案中,蛋白质制品包含RuBisCo。

[0227] 本文所公开的工艺将蛋白质与植物材料中发现的其他化合物分离。例如,所述工艺可去除叶绿素、挥发性化合物、酸、碱、糖、盐和/或脂质。

[0228] 在一些实施方案中,本文所公开的工艺可从植物材料中去除叶绿素,产生去叶绿素化的蛋白质制品。例如,在一些实施方案中,蛋白质制品中叶绿素与蛋白质的重量比低于约1:1000、1:1500、1:2000或1:2500。

[0229] 在一些实施方案中,本文所公开的工艺减少或去除了纯化蛋白质制品中赋予一种或多种感官特性或与一种或多种感官特性相关的一种或多种剂。此类感官特性的非限制性实例包括气味(例如,异常气味或不可接受的气味)和味道(例如,异常味道或不可接受的味道)。在一些实施方案中,本文所公开的工艺使所述一种或多种剂相对于源植物材料减少了5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%。在一些实施方案中,本文所公开的工艺完全减少了一种或多种剂。在一些实施方案中,本文所公开的工艺减少或去除了赋予气味或与气味相关的一种或多种剂,并产生无气味或基本上无气味的蛋白质制品。在一些实施方案中,本文所公开的工艺减少或去除了赋予味道或与味道相关的一种或多种剂,并产生中性味道的蛋白质制品或基本上中性味道的蛋白质制品。在一些实施方案中,本文所公开的工艺减少或去除赋予气味和/或味道或者与气味和/或味道相关的一种或多种剂,并且产生无气味且中性味道的、基本上无气味且中性味道的、无气味且基本上中性味道的,或基本上无气味且基本上中性味道的蛋白质制品。在一些实施方案中,该剂是挥发性化合物。在一些实施方案中,该剂是非挥发性化合物。在一些实施方案中,该剂是多酚、多酚氧化酶、脂氧化酶、酚、脂质、醇、醛、硫化物、过氧化物、萜烯、白蛋白(例如,凝集素或蛋白酶抑制剂)、氧化性酶活性的底物(例如,脂肪酸,诸如(C14:0(肉豆蔻酸甲酯)、C15:0(十五烷酸甲酯)、C16:0棕榈酸甲酯、C16:1棕榈油酸甲酯、C17:0十七烷酸甲酯、C18:0硬脂酸甲酯、C18:1油酸甲酯、C18:2亚油酸甲酯、C18:3 α -亚油酸甲酯、C20:0二十烷酸甲酯和C22:0山嵛酸甲酯和/或与脂质底物反应的酶。在一些实施方案中,纯化蛋白质制品相对于蛋白质来源具有降低的氧化性酶活性。在一些实施方案中,纯化蛋白质制品相对于蛋白质来源具有5%、10%、15%、20%或25%的氧化性酶活性降低。在一些实施方案中,蛋白质的来源是RuBisCo,并且纯化蛋白质制品相对于RuBisCo具有5%、10%、15%、20%或25%的氧化性酶活性降低。在一些实施方案中,氧化性酶活性是脂氧化酶活性。在一些实施方案中,纯化蛋白质制品由于降低的脂氧化酶活性,相对于蛋白质来源具有较低的脂质氧化或残留脂质。

[0230] 在本公开的一个方面,从植物材料制备纯化蛋白质制品的工艺(图1)包括以下步骤:

[0231] a) 提供在包含还原剂的溶液中的植物材料;

[0232] b) 裂解植物材料;

[0233] c) 将裂解的植物材料分离成固相和液相,其中液相含有可溶性蛋白质和叶绿素;

[0234] d) 通过如下方式使液相中的叶绿素凝结:将其在不超过约30分钟内加热至第一设定温度,然后将其在不超过约30分钟内冷却至第二设定温度,其中冷却在液相达到第一设定温度时开始。

[0235] e) 使d)中的液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物;

[0236] f) 将e)中的絮凝的混合物分离成固相和液相;以及

[0237] g) 过滤f)中的液相以产生含有纯化蛋白质的滤液。

[0238] 在一些实施方案中,植物材料在工艺开始前被收获并被清洁。例如,在一些实施方案中,植物材料在工艺开始前被化学清洗。在一些实施方案中,植物材料在工艺开始前用水

清洗。植物材料还可在工艺开始前经受多轮清洗。

[0239] 在一些实施方案中,植物材料被混合在包含还原剂的溶液中。适合在所公开工艺中使用的还原剂的实例包括但不限于2-巯基乙醇(BME)、2-巯基乙胺盐酸盐、偏亚硫酸氢钠、盐酸半胱氨酸、二硫苏糖醇(DTT)、谷胱甘肽、半胱氨酸、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、亚铁离子、初生态氢、钠汞齐、草酸、甲酸、镁、锰、磷酸、钾以及钠。在一些实施方案中,植物材料被混合在包含超过一种还原剂的溶液中。在一些实施方案中,还原剂是亚硫酸盐。在一些实施方案中,还原剂是亚硫酸钠、亚硫酸镁或偏亚硫酸氢钠中的至少一种。在一些实施方案中,还原剂是亚硫酸氢钠。在不希望受理论约束的情况下,据认为还原剂起到调节和/或抑制多酚氧化酶活性的作用。

[0240] 所述包含还原剂的溶液可被配制成提高其组分的稳定性。例如,该溶液的pH值、离子强度或温度可被调节。在一些实施方案中,该溶液可包含缓冲剂。所公开工艺中使用的缓冲剂的实例包括但不限于碱金属(例如, Na^+ 或 K^+)、 NaCl 、铵离子(NH_4)、硝酸盐、醋酸盐(例如,醋酸钠)、氯酸盐、高氯酸盐(NO_3^- 、 $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2^-$ 、 ClO_3^- 、 ClO_4^-)、卤素与金属的二元化合物(例如 Cl^- 、 Br^- 或 I^-)、硫酸盐(SO_4^{2-})、硫酸铵、碱土金属的氢氧化物(例如 OH^- 、 Ca^{2+} 或 Sr^{2+})、硫化物(S^{2-})、氢氧化物(OH^-)、碳酸盐(例如碳酸钠)、草酸盐、铬酸盐(CO_3^{2-} 、 $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ 、 CrO_4^{2-})、磷酸盐(PO_4^{3-}) (例如磷酸钠、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸铵(NH_4) $_3\text{PO}_4$ 、磷酸钙($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)、磷酸镁、磷酸二氢镁、磷酸氢二镁和磷酸三镁)、Tris-HCl、HEPES、ACES、ADA、BES、盐酸咪唑、MES、MOPS、MOPSO、PIPES、TES、Bis-Tris、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、N,N-二(2-羟乙基)甘氨酸(Bicine)、3-[[三(羟甲基)甲基]氨基]丙磺酸、N,N-双(2-羟乙基)甘氨酸、三(羟甲基)甲胺、N-三(羟甲基)甲基甘氨酸、3-[N-三(羟甲基)甲基氨基]-2-羟基丙磺酸、4-2-羟乙基-1-哌嗪乙磺酸、2-[[三(羟甲基)甲基]氨基]乙磺酸、3-(N-吗啉代)丙磺酸、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)、二甲基肿酸、柠檬酸钠、柠檬酸钠盐水、2-(N-吗啉代)乙磺酸、氯化胆胺、乙酰氨基甘氨酸、三(羟甲基)甲基甘氨酸、甘氨酸和碳酸铵。

[0241] 在一些实施方案中,用于在所公开的工艺中使用的溶液包含螯合剂。用于在所公开的工艺中使用的螯合剂的实例包括但不限于氯化物、氰化物、有机酸(包括但不限于柠檬酸、乙醇酸、乳酸、苹果酸、丙二酸、草酸和琥珀酸)、去铁胺、去铁酮、地拉罗司、青霉胺、蜂蜜、焦磷酸钠、六偏磷酸钠、sporix、BAL、EDTA、右雷佐生、普鲁士蓝、ALA、BAPTA、DTP A、DMPS、DMSA、EGTA、核糖、脱氧核糖、葡萄糖、果糖、葡糖胺、蔗糖、乳糖、麦芽糖、纤维素、淀粉、果胶、树胶、海藻酸、甲壳素、壳聚糖、乳酸、丙酮酸、柠檬酸、乙酸、脂质、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、叶黄素、维生素A、可的松、皮质醇、胆酸、脱氧胆酸、牛磺胆酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、脯氨酸、组胺、肾上腺素、胰岛素、ATP、NAD、FMN、FAD、辅酶A、DNA、RNA、碳酸盐、碳酸氢盐、氰化物、乙醇酸、草酸、乳酸、柠檬酸、正磷酸盐、焦磷酸盐、偏磷酸盐、聚磷酸盐、植酸、MDP、HMDP、HEDP、血红蛋白、叶绿素、植物生物碱、花青素、鞣质、硫酸盐、磺酸、硫酸软骨素、维生素B12、抗坏血酸和水。

[0242] 在一些实施方案中,用于在所公开的工艺中使用的溶液包含蛋白酶抑制剂。用于在所公开的工艺中使用的蛋白酶抑制剂的实例包括但不限于PMSF、氟化钠、 β -甘油磷酸盐、

焦磷酸钠、亮抑酶肽和E-64。

[0243] 在一些实施方案中,所述溶液的pH值是约5.0至约9.0。在一些实施方案中,所述溶液的pH值是约6.5至约7.5。在一些实施方案中,所述溶液的pH值是约7.5。在一些实施方案中,所述溶液的pH值是约6.5至约7.0。

[0244] 植物材料和所述包含还原剂的溶液可按增加植物材料对还原剂的可达性的比例混合。例如,植物材料和所述包含还原剂的溶液可按约6:1、3:1、2:1或1:1的比例混合。

[0245] 如本文所用,术语“裂解”是指破碎来自植物材料的细胞并暴露细胞的内容物。例如,裂解可包括打破细胞壁、破坏质膜和/或暴露胞质。裂解植物材料的方法是本领域已知的,并且可包括机械、化学和/或酶促裂解。在一些实施方案中,植物材料被机械裂解。适用于所公开工艺中的机械裂解的实例包括但不限于机械搅拌、压力、研磨、挤压和剪切。在一些实施方案中,植物材料是使用共混机进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用研磨机,例如利用刀式研磨机、高剪切研磨机、胶体研磨机、球磨机、波士顿剪切研磨机、锤磨机、研磨粉碎机、Rietz研磨机、湿磨机或高剪切研磨机进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用至少两种不同类型的研磨机(例如,通过串联研磨)进行机械裂解的。在不希望受理论约束的情况下,据认为在一些实施方案中,使用至少两种不同类型的研磨机对植物材料机械裂解导致植物材料被更有效地裂解。在一些实施方案中,植物材料是使用超声仪、使用氮爆搅动、使用超声能量或利用冷冻进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用压机(例如螺杆压机或French压机)进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用匀浆器(例如高压匀浆器或微流化器)进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用粉碎机进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用脉冲电场(PEF)进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用机械压力进行机械裂解的。在一些实施方案中,植物材料是使用一种或多种本文所公开的机械裂解的技术进行机械裂解的。

[0246] 在一些实施方案中,植物材料被化学裂解。在一些实施方案中,植物材料是使用一种或多种洗涤剂进行化学裂解的。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是离子型洗涤剂。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是阳离子型洗涤剂。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是阴离子型洗涤剂。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂包括十二烷基硫酸钠(SDS)。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是非离子型洗涤剂,诸如Triton X-100、NP-40、毛地黄皂苷和/或皂苷。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是两性离子洗涤剂,诸如Triton、NP、Brij、吐温、辛基- β -葡糖苷、辛基硫代葡糖苷、SDS、CHAPS和/或CHAPSO。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是低渗洗涤剂。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是高渗洗涤剂。在一些实施方案中,所述一种或多种洗涤剂是等渗洗涤剂。在一些实施方案中,植物材料是使用一种或多种本文所公开的化学裂解的技术进行化学裂解的。

[0247] 在一些实施方案中,植物材料是使用一种或多种酶进行酶促裂解的。在一些实施方案中,所述一种或多种酶包括纤维素酶。在一些实施方案中,所述一种或多种酶包括果胶酶。

[0248] 在一些实施方案中,植物材料被化学和机械裂解。在一些实施方案中,植物材料被化学和酶促裂解。在一些实施方案中,植物材料被机械和酶促裂解。在一些实施方案中,植

物材料被化学、机械和酶促裂解。

[0249] 在一些实施方案中,植物材料的裂解包括向裂解液中加入一种或多种二价离子。在一些实施方案中,植物材料的裂解包括向裂解液中加入壳聚糖。在一些实施方案中,植物材料的裂解包括向裂解液中加入一种或多种二价离子和向裂解液中加入壳聚糖。在一些实施方案中,植物材料的裂解包括向裂解液中加入钙离子。在一些实施方案中,植物材料的裂解包括向裂解液中加入钙离子和向裂解液中加入壳聚糖。在一些实施方案中,植物材料的裂解包括向裂解液中加入氯化钙。在一些实施方案中,植物材料的裂解包括向裂解液中加入氯化钙和向裂解液中加入壳聚糖。

[0250] 可通过本领域已知的任何固液分离技术来将所裂解的植物材料分离成固相和液相。适合用于所公开工艺中的此类分离技术的实例包括过筛、过滤、离心和倾析。在一些实施方案中,将所裂解的植物材料分离成固相和液相是用螺杆压机、倾析器或离心机来执行的。在一些实施方案中,将所裂解的植物材料分离成固相和液相是使用碟片离心机、倾析式离心机、连续离心机或篮式离心机来执行的。在一些实施方案中,将所裂解的植物材料分离成固相和液相包括过滤,包括但不限于使用死端过滤系统、使用超滤、使用正切流过滤系统或使用平板过滤器。在一些实施方案中,将所裂解的植物材料分离成固相和液相包括使用压机,包括但不限于螺杆压机(screw press)、French压机、带式压机(belt press)、过滤器式压机(filter press)、风机式压机(fan press)、整理机式压机(finisher press)或旋转压机(rotary press)。在一些实施方案中,将所裂解的植物材料分离成固相和液相包括使用重力沉降。在一些实施方案中,将所裂解的植物材料分离成固相和液相包括过筛,包括但不限于使用圆形振动分离器或直线/倾斜运动振荡器(motion shaker)。在一些实施方案中,液相包含可溶性蛋白质和叶绿素。在一些实施方案中,固相包含不溶性蛋白质、木素、纤维等。

[0251] 将所裂解的植物材料分离成固相和液相可产生在各种应用中有用的材料,所述各种应用包括但不限于农业应用。例如,通过分离所裂解植物材料获得的液相可包含可溶性蛋白质、叶绿素、酚类化合物、细胞膜(例如脂质)、碳水化合物(包括但不限于果胶)、核酸和/或获光复合物/光系统。例如,通过分离所裂解植物材料获得的固相可包含一种或多种植物纤维、纤维素、半纤维素、果胶、完整植物细胞、细胞的细胞器、不溶性蛋白质、叶绿素和/或脂肪。在一些实施方案中,这种固相可被用作例如动物饲料或用作生物燃料。在一些实施方案中,这种固相可含有乙酰丙酸,其是生物燃料生产的前体。在一些实施方案中,从通过分离所裂解植物材料获得的固相获得的叶绿素可被用于例如化妆品应用(作为染料)和/或人和/或动物营养物中。

[0252] 制备纯化蛋白质制品的工艺还可包括使用热处理凝结不需要的组分(例如,非RuBisCO的组分)而使所需蛋白质组分(例如RuBisCO)留在液相中的步骤。在不受理论约束的情况下,加热使氨基酸链发生构象解折叠,导致一些蛋白质聚集。根据它们的氨基酸序列和构象状态,蛋白质具有不同的解折叠温度,大于该温度它们将开始解折叠和聚集。通过仔细控制加热和冷却条件,可使解折叠温度低于所需蛋白质产品的解折叠温度的蛋白质凝结。在一些实施方案中,加热是在温和条件下进行以防止所关注的蛋白质也发生聚集。在一些实施方案中,液相被加热至第一设定温度。在一些实施方案中,第一设定温度不超过约40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃或80℃。在一些实施方案中,加热是快速进行

的。在一些实施方案中,加热至第一设定温度耗时不超过约30min。在一些实施方案中,加热至第一设定温度耗时不超过约15min。在一些实施方案中,加热至第一设定温度耗时不超过约5min。在一些实施方案中,液相在加热至第一设定温度后被冷却至第二设定温度。在一些实施方案中,第二设定温度不低于约30℃、25℃、20℃、15℃、10℃或5℃。在一些实施方案中,所述冷却在达到第一设定温度后立即启动。在一些实施方案中,冷却是快速进行的。在一些实施方案中,冷却至第二设定温度耗时不超过约30min。在一些实施方案中,冷却至第二设定温度耗时不超过约15min。在一些实施方案中,冷却至第二设定温度耗时不超过约5min。

[0253] 制备纯化蛋白质制品的工艺还可包括通过加入一种或多种盐凝结不需要的组分(例如,非RuBisCO的组分)而使所需蛋白质组分(例如RuBisCO)留在液相中的步骤。在一些实施方案中,所述盐为钙盐、镁盐、铍盐、锌盐、镉盐、铜盐、铁盐、钴盐、锡盐、铟盐、钽盐、镭盐或其组合。在一些实施方案中,所述盐为氯化钙、硝酸钙或碳酸铁。在一些实施方案中,加入的盐为磷酸钾。在一些实施方案中,加入的盐为氯化钙。在一些实施方案中,加入的盐为磷酸钾和氯化钙。在一些实施方案中,所述一种或多种盐是以5mM至2M的浓度添加的。

[0254] 在一些实施方案中,制备纯化蛋白质制品的工艺还可包括通过加入一种或多种促凝剂凝结不需要的组分(例如,非RuBisCO的组分)而使所需蛋白质组分(例如RuBisCO)留在液相中的步骤,其中促凝剂是季氨物质,包括但不限于质子化的季铵、仲铵或伯铵物质。在一些实施方案中,促凝剂选自表胺(epiamines)、聚羧酸、聚乙烯亚胺、聚赖氨酸和阳离子型聚丙烯酰胺。在一些实施方案中,促凝剂是基于聚合物的促凝剂。在一些实施方案中,聚合物是两性离子型的。在一些实施方案中,聚合物为溶液或乳液的形式。在一些实施方案中,聚合物是颗粒状的。在一些实施方案中,聚合物为珠粒。在一些实施方案中,聚合物是不带电荷的。在一些实施方案中,聚合物具有从低于1%至最高100%理论摩尔的电荷密度。在一些实施方案中,聚合物具有从500道尔顿至2000万道尔顿的分子量。在一些实施方案中,聚合物具有大于2000万道尔顿的分子量。

[0255] 在一些实施方案中,制备纯化蛋白质制品的工艺还可包括通过电凝法凝结不需要的组分(例如,非RuBisCO的组分)的步骤。在电凝法的一些实施方案中,水通过电凝结池,其中一种或多种金属离子被驱入水中,其中在阴极表面,水被水解为氢气和羟基,其中电子自由流动以使悬浮固体和乳化油上的表面电荷不稳定,其中大絮状物形成,其可夹带悬浮固体、重金属、乳化油和其他污染物,并且其中絮凝物在下游固体分离和/或一次或多次过滤操作中从水中被除去。

[0256] 制备蛋白质制品的工艺还可包括使液相与絮凝剂和/或吸附剂接触,并混合足以使液相中的叶绿素絮凝和/或吸附至吸附剂的时长,从而形成絮凝的混合物的步骤。如本文所用,术语“絮凝剂”是指被添加用于使胶体失稳并使它们从悬液中析出的物质。术语“吸附”是指分子粘附到固体表面或“吸附剂”上。絮凝过程是本领域众所周知的,并且示例性絮凝剂可包括但不限于烷基胺环氧氯丙烷、聚二甲基二烯丙基氯化铵、多糖(例如壳聚糖)、多胺、淀粉、硫酸铵、明矾、聚丙烯酰胺(polyacrylamide)、polyacromide或聚乙烯亚胺。在一些实施方案中,絮凝剂是活化壳聚糖。在一些实施方案中,絮凝剂是1-20%w/v呈溶液形式的活化壳聚糖。用于活化壳聚糖并将壳聚糖溶解成溶液的方法是本领域众所周知的,可使用任何方法来制备呈溶液形式的活化壳聚糖。示例性方法可能涉及将1%壳聚糖溶解于

20%乙酸和79%水中。吸附剂是本领域众所周知的,并且示例性吸附剂可包括活性炭、石墨、硅胶、沸石、黏土、聚乙烯等。示例性吸附剂还可包括树脂。在一些实施方案中,用于在所公开的工艺中使用的树脂包括离子交换树脂,包括但不限于强阳离子交换剂、弱阳离子交换剂、强阴离子交换剂、弱阴离子交换剂、混合床树脂、螯合树脂和聚合催化剂。在一些实施方案中,用于在所公开的工艺中使用的树脂是尺寸排阻色谱(SEC)树脂,包括但不限于 Sephacryl、Sephadex、Sephacryl 和 Superdex (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Westborough, Massachusetts)。在一些实施方案中,用于在所公开的工艺中使用的树脂对底物类似物、抗体-抗原、多糖(例如凝集素)、互补碱基序列(例如核酸)、受体(例如激素)、卵白素-生物素、钙调蛋白、poly-A、谷胱甘肽、蛋白质A和G和/或金属离子具有亲和力。在一些实施方案中,用于在所公开的工艺中使用的树脂具有疏水相互作用,诸如包含苯基、丁基、辛基、己基、醚和/或PPG的树脂。

[0257] 在一些实施方案中,吸附剂是活性炭、活化木炭或活化煤。在一些实施方案中,活性炭的表面积超过250m²/g,重量平均直径为1-1000μm,碘值为400-1,400mg/g,糖蜜值在100-550范围内,并且/或者亚甲蓝吸附值为至少10g/100g。在一些实施方案中,液相与聚合物接触。在一些实施方案中,聚合物是非离子型的。在一些实施方案中,聚合物是阴离子型的。在一些实施方案中,聚合物是阳离子型的。在一些实施方案中,聚合物是两性离子型的。在一些实施方案中,聚合物为溶液或乳液的形式。在一些实施方案中,聚合物是颗粒状的。在一些实施方案中,聚合物为珠粒。在一些实施方案中,聚合物是不带电荷的。在一些实施方案中,聚合物具有从低于1%至最高100%理论摩尔的电荷密度。在一些实施方案中,聚合物具有从500道尔顿至2000万道尔顿的分子量。在一些实施方案中,聚合物具有大于2000万道尔顿的分子量。在不受理论约束的情况下,液相中的叶绿素可絮凝从而形成较大粒径的颗粒,然后其吸附到活性炭、活化木炭或活化煤的表面上。絮凝的混合物包含固相和液相,其中固相包含絮凝剂、吸附剂、不溶性蛋白质和叶绿素,液相包含呈溶液形式的可溶性蛋白质。

[0258] 然后,可将絮凝的混合物分离成固相和液相。分离絮凝的混合物可通过本领域已知的任何固液分离技术进行。适合用于所公开工艺中的此类分离技术的实例包括过筛、过滤、离心和倾析。在一些实施方案中,将絮凝的混合物分离成固相和液相是使用螺杆压机、倾析器或微孔过滤进行的。在一些实施方案中,将絮凝的混合物分离成固相和液相包括离心,诸如使用沉降式离心机、碟片离心机或连续离心机。在一些实施方案中,将絮凝的混合物分离成固相和液相包括过滤,诸如使用死端过滤系统、超滤,使用正切流过滤系统或平板过滤器。在一些实施方案中,将絮凝的混合物分离成固相和液相包括使用压机,诸如螺杆压机、French压机、带式压机、过滤器式压机、风机式压机、整理机式压机或旋转压机。在一些实施方案中,将絮凝的混合物分离成固相和液相包括重力沉降。在一些实施方案中,将絮凝的混合物分离成固相和液相包括过筛。

[0259] 在一些实施方案中,将絮凝的混合物分离成固相和液相包括去除疏水吸附剂。在一些实施方案中,去除疏水吸附剂包括离心,诸如使用碟片离心机、连续离心机或篮式离心机。在一些实施方案中,去除疏水吸附剂包括过滤,包括但不限于使用死端过滤系统、使用超滤、使用正切流过滤系统或使用平板过滤器。在一些实施方案中,去除疏水吸附剂包括使用压机,包括但不限于螺杆压机、French压机、带式压机、过滤器式压机、风机式压机、整理

机式压机或旋转压机。在一些实施方案中,去除疏水吸附剂包括使用重力沉降。在一些实施方案中,去除疏水吸附剂包括过筛。在一些实施方案中,去除疏水吸附剂包括柱过滤。将絮凝的混合物分离成固相和液相可产生在各种应用中有用的材料,所述各种应用包括但不限于农业应用。例如,当吸附剂为活性炭、活化木炭或活化煤时,液相可包含可溶性蛋白质,并且固相可包含活性炭、活化木炭或活化煤和酚类化合物、颜料和/或细胞膜。来自固相的酚类化合物可被用于人和/或动物营养物中。例如,在一些实施方案中,酚类化合物包括类胡萝卜素,其可用于例如营养补充剂中。在一些实施方案中,酚类化合物可用于防晒剂中。在一些实施方案中,来自固相的活性炭、活化木炭或活化煤可被重复使用。在一些实施方案中,来自固相的活性炭、活化木炭或活化煤可被应用于植物中以例如改善保水性。在一些实施方案中,来自固相的活性炭、活化木炭或活化煤可被应用于生物燃料技术中。例如,在一些实施方案中,来自固相的活性炭、活化木炭或活化煤可用于生产生物炭。

[0260] 在一些实施方案中,用于在所公开的工艺中使用的液相和/或滤液可包含抑泡剂和/或消泡剂。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂为油消泡剂。在油消泡剂的一些实施方案中,油是矿物油、植物油、白油,或除硅酮油外的在发泡介质中不可溶的任何油。在一些实施方案中,基于油的消泡剂含有蜡和/或疏水二氧化硅。在一些实施方案中,蜡选自亚乙基双硬脂酰胺(EBS)、石蜡、酯蜡和脂肪醇蜡。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂为粉末消泡剂。在一些实施方案中,粉末消泡剂是在特定载体(诸如二氧化硅)上的基于油的消泡剂。在一些实施方案中,粉末消泡剂被添加到粉末产品(诸如水泥、石膏和洗涤剂)中。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂是基于水的消泡剂。在一些实施方案中,基于水的消泡剂包含在水基质中的一种或多种油和/或蜡,诸如矿物油、植物油、长链脂肪醇和脂肪酸皂或酯。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂是基于硅的消泡剂。在一些实施方案中,基于硅的消泡剂是含硅主链的聚合物。在一些实施方案中,基于硅的消泡剂是以基于油或水的乳液提供。在一些实施方案中,硅化合物包括分散于硅酮油中的疏水二氧化硅或由其组成。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂是基于硅的消泡剂,其包含乳化剂。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂是基于硅的消泡剂,其包含硅酮二醇和/或其他改性硅酮流体。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂是基于E0/P0的消泡剂。在一些实施方案中,抑泡剂和/或消泡剂是基于E0/P0的消泡剂,其包含聚乙二醇和/或聚丙二醇共聚物。在一些实施方案中,抑泡剂和/或抑泡剂和/或消泡剂是基于E0/P0的消泡剂,其以油、水溶液或基于水的乳液形式提供。

[0261] 将絮凝的混合物分离成固相和液相可产生在各种应用中有用的材料,所述各种应用包括但不限于农业应用。例如,液相可包含可溶性蛋白质,过量絮凝剂(例如壳聚糖),其他连接、支化或线性的多糖(包括但不限于离子型、非离子型和/或中性多糖),维生素B-12,氯化钙或其他二价离子(例如氯化镁),RuBisCo,获光复合物/光系统,可溶性蛋白质,细胞膜,酚类化合物,类胡萝卜素,黄体素和/或叶黄素(xanthophyll)。例如,固相可包含叶绿素、磷酸钙、细胞膜、获光复合物/光系统和/或壳聚糖。在一些实施方案中,该固相可被用作例如动物饲料或用作生物燃料。在一些实施方案中,该固相可含有乙酰丙酸,其是潜在的生物燃料前体。在一些实施方案中,从分离所裂解植物材料获得的固相获得的叶绿素可被用于例如化妆品应用(作为染料)和/或人和/或动物营养物中。

[0262] 为了使液相中的可溶性蛋白质稳定,在低温下执行工艺的步骤可能是有利的。低

温可防止可溶性蛋白质变性。在一些实施方案中,絮凝的混合物的分离是在不超过约35℃、30℃、25℃、20℃、15℃、10℃或5℃下进行。在一些实施方案中,制备蛋白质制品的工艺除加热步骤外的所有步骤都是在不超过约35℃、30℃、25℃、20℃、15℃、10℃或5℃下进行。

[0263] 在将絮凝的混合物分成固相和液相后,可过滤液相以获得含有纯化蛋白质的滤液。过滤方法是本领域众所周知的,并且可通过利用表面过滤器或深层过滤器,例如通过薄膜过滤、柱过滤、渗滤、超滤、正切流过滤等来执行。在一些实施方案中,絮凝的混合物的液相过滤利用膜式过滤器来执行。在一些实施方案中,絮凝的混合物的液相过滤利用5.0μm、4.0μm、3.0μm、2.0μm、1.0μm、0.7μm、0.5μm、0.22μm膜式过滤器来执行。在一些实施方案中,絮凝的混合物的液相过滤是通过用硅藻土进行表面或深层过滤来执行。在一些实施方案中,絮凝的混合物的液相过滤是通过用淤泥(silt)进行表面或深层过滤来执行。在一些实施方案中,絮凝的混合物的液相过滤是通过用活性炭进行表面或深层过滤来执行。在一些实施方案中,絮凝的混合物的液相过滤利用最高约10%、8%、6%、4%、2%或1%活性炭来执行。在一些实施方案中,絮凝的混合物的液相过滤包括多个过滤步骤或模式。例如,可用膜式过滤器和活性炭床执行过滤。在一些实施方案中,利用0.2μm膜式过滤器执行过滤,并且使蛋白质液体暴露于约2%的活性炭中。在一些实施方案中,通过膜式过滤器,例如通过5.0μm、4.0μm、3.0μm、2.0μm、1.0μm、0.7μm、0.5μm或0.2μm膜式过滤器进一步过滤滤液。

[0264] 在一些实施方案中,可将小固体和/或微生物从液相和/或滤液中去除。在一些实施方案中,可通过微孔过滤,诸如通过使用单通式死端微孔过滤系统或正切流过滤系统,从液相和/或滤液中去除小固体和/或微生物。

[0265] 在一些实施方案中,可对液相和/或滤液进行灭菌。在一些实施方案中,通过微孔过滤,诸如通过使用单通式死端微孔过滤系统或正切流过滤系统对液相和/或滤液进行灭菌。在一些实施方案中,通过紫外(UV)辐照对液相和/或滤液进行灭菌。在一些实施方案中,通过伽马辐照对液相和/或滤液进行灭菌。在一些实施方案中,通过巴氏杀菌,诸如通过高压巴氏杀菌或高温短时巴氏杀菌对液相和/或滤液进行灭菌。

[0266] 可进一步浓缩包含蛋白质制品的滤液。可使用本领域已知的方法来浓缩溶质。在一些实施方案中,浓缩滤液可通过经具有合适的截止值的过滤器超滤来执行。在一些实施方案中,浓缩滤液可通过经聚醚砜、聚丙烯、聚偏二氟乙烯、聚丙烯腈、醋酸纤维素或聚砜超滤来执行。在一些实施方案中,浓缩滤液可通过蒸发来执行。浓缩滤液可通过反渗透来执行。截止过滤器的尺寸可根据所关注的蛋白质来优化。在一些实施方案中,超滤使用截止值不超过约200kDa、150kDa、100kDa、75kDa、50kDa、25kDa、10kDa或5kDa的过滤器来执行。

[0267] 在一些实施方案中,可透析液相和/或滤液。在一些实施方案中,透析可使用超滤来进行。在一些实施方案中,透析可使用经聚醚砜、聚丙烯、聚偏二氟乙烯、聚丙烯腈、醋酸纤维素或聚砜超滤来执行。在一些实施方案中,透析可使用反渗透来执行。

[0268] 在一些实施方案中,可干燥液相和/或滤液。在一些实施方案中,干燥可使用喷雾干燥器、冷冻干燥器、滚筒干燥、薄膜干燥、床干燥、快速干燥器或旋转干燥器来完成。

[0269] 本文所公开的工艺实现了高收率的纯化蛋白的制备。本文所公开的工艺可被用于制备纯化蛋白质的高纯度制品。有利的是,本文所公开的步骤可在植物材料裂解后在液相中产生至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或99%的收率的可溶性蛋白质量。在一些实施方案中,所述蛋白质制品的纯度为至少约30%、

40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0270] 本文所公开的工艺可被用于从植物材料提取可观水平的蛋白质。RuBisCo是在光合成生物的叶绿体中被发现的酶,其被用于催化固碳的第一个重要步骤。在绿色植物材料中发现的总蛋白中,最高约50%可由RuBisCo组成,使其成为叶中含量最丰富的蛋白。在一些实施方案中,蛋白质制品是RuBisCo。在一些实施方案中,植物材料来自浮萍、海藻、甜菜根、叶用甜菜、牛皮菜、糖用甜菜、海甜菜、Mangel甜茶、大豆或烟草。

[0271] 本公开的另一个方面涉及通过本文所公开的工艺制备的产品。

[0272] 本公开的又一个方面涉及包含来自植物材料的纯化蛋白质制品的食品。有利的是,包含蛋白质制品的食品可含有不超过30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或95%的杂质。在一些实施方案中,包含蛋白质制品的食品包含RuBisCo。在一些实施方案中,所述蛋白质是用来自浮萍属的植物材料制备的。在一些实施方案中,所述蛋白质是用来自浮萍亚科的植物材料制备的。

[0273] 蛋白质形成凝胶和稳定泡沫的能力在多种食品的生产中很重要。如本文所用,泡沫是指通过在液体或固体中捕获气穴所形成的结构。泡沫中的蛋白质有助于泡沫形成小气室的能力和保持该结构的稳定性。具有均匀分布的小气泡的泡沫可赋予食品香醇度、光滑度和光亮度。蛋白质制品形成泡沫的能力与其纯度相关,并且可能需要至少约80%的纯度来形成稳定泡沫。如本文所用,凝胶是包含大量的水相的软固体。蛋白质凝胶可包含在整个基质中具有连续水相的蛋白质纤维的三维网络。具有较高胶凝能力的蛋白质形成凝胶需要的蛋白质较少。本文所公开的工艺可被用于制备具有有利地高纯度、发泡能力、泡沫稳定性和胶凝能力的蛋白质制品,其适合用于食品产品。

[0274] 本公开可利用以下非限制性实施例进一步阐明。

[0275] 实施例

[0276] 表征了通过实施例1-4和比较实施例1中详述的下面的工艺制备的可溶性蛋白质和冷冻干燥蛋白质制品。通过Pierce 660nm Protein Assay (Thermo-Scientific Inc.)测量了冷冻干燥之前溶液中可溶性蛋白质的浓度。通过Dumas方法来测量蛋白质的纯度。用每种可溶性制品生产泡沫,并测量发泡特征。发泡能力(FC)计算为:

[0277] $FC = (\text{发泡后的体积} - \text{发泡前的体积}) / \text{发泡前的体积} \times 100\%$ 。

[0278] 发泡后时间间隔t时的发泡稳定性计算为:

[0279] $\text{发泡稳定性} = \text{时间t时的残留泡沫体积} / \text{初始泡沫体积} \times 100\%$ 。

[0280] 实施例1

[0281] 将1kg的新鲜小浮萍以1:1的比例与含0.3%w/v亚硫酸氢钠的碳酸钠缓冲液一起在Vitamix共混机(Vitamix Corp, Cleveland, Ohio)中浸软。在中速设置下执行提取3分钟,维持温度低于30℃。随后,通过使用具有细网孔的尼龙筛滤袋(Natural Home Brands, Sun Valley, California)过滤浸软的生物质,以将纤维性高固体饼从含有可溶性蛋白质的液体汁液中分离。然后,将滤过的匀浆物以4000g的速度/力离心10分钟(Allegra X15R, SX4750电机; Beckman Coulter, Inc., Pasadena, California)。丢弃沉淀,并单独收集上清液。将溶液在被设定为55℃的温度下的水浴中加热至50℃的温度,并将其在达到目标温度后快速冷却至低于15℃的温度。在快速冷却蛋白质溶液后,向液体汁液中加入2%v/v活化壳聚糖和4%w/v活化石(Cabot Norit Americas Inc, Marshall, Texas)。随后将溶液搅拌5分钟,然

后将溶液以5000g的速度/力离心10分钟 (Allegra X15R, SX4750电机; Beckman Coulter, Inc., Pasadena, California)。丢弃离心瓶中的绿色沉淀, 并且使用0.7 μ m玻璃微纤维膜 (Whatman 1825-047玻璃微纤维无粘合剂过滤器, 0.7 μ m; Global Life Sciences Solutions USA LLC, Marlborough, Massachusetts) 对澄清的黄色上清液进行微孔过滤。随后, 将滤液暴露于0.2 μ m聚醚砜膜 (聚醚砜 (PES) 膜式过滤器, 0.2 μ m; Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington) 中以去除剩余的包括细菌的不需要的颗粒。然后, 将获得的淡黄色的经去味的蛋白质溶液使用70kDa膜 (**MINIKROS®** S02-E070-05-N; Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California) 来浓缩。随后, 将获得的浓缩的溶液冷冻干燥 (Harvest Right LLC, Salt Lake City, Utah), 产物为白色、无气味的可溶性蛋白质粉末。

[0282] 实施例2

[0283] 将1kg的新鲜小浮萍以1:1的比例与含0.3%w/v抗坏血酸的磷酸钾缓冲液一起在Vitamix共混机 (Vitamix Corp, Cleveland, Ohio) 中浸软。在中速下执行浸软3分钟时间以维持温度低于30℃。通过使用具有细网孔的尼龙筛滤袋 (Natural Home Brands, Sun Valley, California) 过滤裂解的生物物质, 以将纤维性高固体饼从含有可溶性蛋白质的液体汁液中分离。然后, 将滤过的匀浆物以4000g的速度/力离心10分钟 (Allegra X15R, SX4750电机; Beckman Coulter, Inc., Pasadena, California)。丢弃沉淀, 并单独收集上清液。然后, 将上清液与5%v/v活化壳聚糖 (Chitosan (10-120cps), fungal origin (9012-76-4); Glenham Life Sciences Ltd., Corsham, Wiltshire, UK) 和10%w/v活化石 (Cabot Norit Americas Inc, Marshall, Texas) 混合5分钟时间。随后, 将混合溶液以5000g的速度/力离心10分钟 (Allegra X15R, SX4750电机; Beckman Coulter, Inc., Pasadena, California)。丢弃获得的沉淀, 并将经去味且脱色的上清液用0.2 μ m聚醚砜膜 (聚醚砜 (PES) 膜式过滤器, 0.2 μ m; Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington) 进行微孔过滤。然后, 将获得的淡黄色的经去味的蛋白质溶液用70kDa膜 **MINIKROS®** S02-E070-05-N; Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California) 进行浓缩。随后, 将获得的浓缩的溶液冷冻干燥 (Harvest Right LLC, Salt Lake City, Utah), 产物为白色、无气味的可溶性蛋白质粉末。

[0284] 实施例3

[0285] 将1kg的新鲜小浮萍以1:1的比例与含0.3%w/v亚硫酸氢钠和抗坏血酸的蒸馏水一起在Vitamix共混机 (Vitamix Corp, Cleveland, Ohio) 中浸软。在中速下执行浸软3分钟时间以维持温度低于30℃。通过使用具有细网孔的尼龙筛滤袋 (Natural Home Brands, Sun Valley, California) 过滤裂解的生物物质, 以将纤维性高固体饼从含有可溶性蛋白质的液体汁液中分离。然后, 将滤过的匀浆物以4000g的速度/力离心10分钟。丢弃沉淀, 并单独收集上清液。然后, 将上清液与含30mM磷酸钾和20mM氯化钙的溶液混合5分钟时间。随后, 将混合溶液以5000g的速度/力离心10分钟 (Allegra X15R, SX4750电机; Beckman Coulter, Inc., Pasadena, California)。丢弃获得的沉淀。向上清液中添加5%w/v活化石 (Cabot Norit Americas Inc, Marshall, Texas), 并且将溶液搅拌5分钟。随后, 使用0.2 μ m聚醚砜膜式过滤器 (聚醚砜 (PES) 膜式过滤器, 0.2 μ m; Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington) 对含有活化石的混合溶液进行微孔过滤, 以去除已吸附剩余叶绿素、多酚和其他不希望的影

响味道/颜色/气味的颗粒的活化石。然后,使用100kDa膜(中空纤维柱,100,000NMWC,850cm²;GE Healthcare Bio-Sciences Corp,Westborough,Massachusetts)将获得的淡黄色的经去味的蛋白质溶液浓缩。随后,将获得的浓缩的溶液冷冻干燥,产物为白色、无气味的可溶性蛋白质粉末。

[0286] 实施例4

[0287] 将1kg的新鲜小浮萍以1:1的比例与含0.5%w/v亚硫酸氢钠的蒸馏水一起在Vitamix共混机(Vitamix Corp,Cleveland,Ohio)中浸软。在中速下执行浸软3分钟时间以维持温度低于30℃。通过使用具有细网孔的尼龙筛滤袋(Natural Home Brands,Sun Valley,California)过滤裂解的生物物质,以将纤维性高固体饼从含有可溶性蛋白质的液体汁液中分离。然后,将滤过的匀浆物以4000g的速度/力离心10分钟(Allegra X15R,SX4750电机;Beckman Coulter,Inc.,Pasadena,California)。丢弃沉淀,并单独收集上清液。然后,将上清液与含30mM磷酸钾和20mM氯化钙的溶液混合5分钟时间。随后,将混合溶液以5000g的速度/力离心10分钟(Allegra X15R,SX4750电机;Beckman Coulter,Inc.,Pasadena,California)。丢弃获得的沉淀。向上清液中添加2%w/v活化石(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glentham Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK)和4%活化石(Cabot Norit Americas Inc,Marshall,Texas),并将溶液搅拌5分钟。随后,将混合溶液以5000g的速度/力离心10分钟(Allegra X15R,SX4750电机;Beckman Coulter,Inc.,Pasadena,California)。丢弃获得的沉淀,并且使用0.7μm聚醚砜膜(Whatman 1825-047玻璃微纤维无粘合剂过滤器,0.7μm;Global Life Sciences Solutions USA LLC,Marlborough,Massachusetts)对经去味且脱色的上清液进行微孔过滤。然后,使用0.2μm聚醚砜膜(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.2μm;Sterlitech Corporation Inc,Kent,Washington)对滤液作进一步微孔过滤。然后,将获得的淡黄色的经去味的蛋白质溶液用70kDa膜(MINIKROS® S02-E070-05-N;Spectrum Laboratories,Inc.,Rancho Dominguez,California)进行浓缩。随后,将获得的浓缩的溶液冷冻干燥(Harvest Right LLC,Salt Lake City,Utah),产物为白色、无气味的可溶性蛋白质粉末。

[0288] 实施例1-4的结果

[0289] 通过实施例1-4的方法制备的蛋白质制品的平均纯度为约84.3%,并且超滤后可溶性蛋白质的浓度为1,316μg/mL。达到的发泡能力为195%,并且1小时后维持92%稳定性。验证了冷冻干燥材料的凝胶化性能,并且形成凝胶仅需加入2%w/v的冷冻干燥材料。

[0290] 比较实施例1

[0291] 浮萍叶蛋白质是按W02011/0778671A1(van de Velde等人)中所述并进行了一些修改来进行提取的。

[0292] 洗涤1kg新鲜浮萍并将其与0.3%w/v亚硫酸氢钠按2:1的比例在Vitamix共混机中浸软。将匀浆物通过干酪包布(cheese cloth)过筛,之后加热至最高60℃。将滤液在60℃下保存5分钟,然后冷却至10℃。在热处理后,将悬浮液以5200g离心5分钟。接下来,按5%w/w的量向上清液中加入活化石。添加活化石后,搅拌悬浮液5分钟,然后通过倾析去除上清液。

[0293] 对获得的上清液执行两个微孔过滤步骤。首先,使上清液通过孔径为0.7μm的微孔过滤器(Whatman 1825-047玻璃微纤维无粘合剂过滤器,0.7μm;Global Life Sciences Solutions USA LLC,Marlborough,Massachusetts)。

[0294] 随后,使滤液通过孔径为0.2 μ m的微孔过滤器(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.2 μ m; Sterlitech Corporation Inc,Kent,Washington)。然后,冷冻干燥该滤液,产物为带白色的无气味粉末。

[0295] 比较实施例1的结果

[0296] 蛋白质的纯度近似为34.1%/单位干物质,冷冻干燥前可溶性蛋白质的浓度为520 μ g/mL。冷冻干燥材料的发泡性能显示总发泡强度为92%,1小时后稳定性为62%。验证了冷冻干燥材料的凝胶化性能,并且形成凝胶需加入至少7%w/v的冷冻干燥材料。

[0297] 表1.

样品	纯度(每单位干物质的%)
实施例1	88.2
实施例2	85.2
实施例3	82.1
实施例4	78.9
比较实施例1	34.1

[0299] 实施例5

[0300] 此实施例研究了使用氯化钙凝结叶绿素-蛋白质复合物来去除叶绿素。

[0301] 用包含2%偏亚硫酸氢盐、0.1M NaCl的提取缓冲液裂解2kg生物质(Vitamix Corp,Cleveland,Ohio)。然后,从滤液制备四个馏分,全部4个馏分的体积均为375mL。全部馏分均以速度4混合,并且对所有馏分进行离心,步骤设定为5200g和5分钟。使用布氏漏斗与涂布有DE(Dicalite Management Group Inc,Bala Cynwyd,Pennsylvania)的0.45 μ m截止过滤片(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.45 μ m;Sterlitech Corporation Inc,Kent, Washington)进行过滤。

[0302] 馏分1:添加3.75g磷酸盐缓冲剂,以在馏分中达到10mM的浓度。然后,使馏分通过设定为68℃的热浴步骤运行,然后加入15g活性炭(Cabot Norit Americas Inc,Marshall, Texas)并混合25分钟。然后,添加15g 3%壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glentham Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK),并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。

[0303] 馏分2:添加3.75g磷酸盐缓冲剂,以在馏分中达到10mM的浓度。然后,向该馏分中添加15g活性炭(Cabot Norit Americas Inc,Marshall,Texas)并混合15分钟。然后,添加15g 3%壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glentham Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK),并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。

[0304] 馏分3:添加3.75g磷酸盐缓冲剂和2.81g氯化钙溶液,以分别在馏分中达到10mM和7.5mM的浓度。然后,向该馏分中添加15g活性炭(Cabot Norit Americas Inc,Marshall, Texas)并混合15分钟。然后,添加15g 3%壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glentham Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK),并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。

[0305] 馏分4:添加7.5g磷酸盐缓冲剂和5.63g氯化钙溶液,以分别在馏分中达到20mM和15mM的浓度。然后,向该馏分中添加15g活性炭(Cabot Norit Americas Inc,Marshall, Texas)并混合15分钟。然后,添加15g 3%壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-

4);Glenthams Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK),并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。

[0306] 表2:示意变量表

馏分	热浴	磷酸盐浓度 (mM)	氯化钙浓度 (mM)
1	是	10	0
2	否	10	0
3	否	10	7.5
4	否	20	15

[0308] 图5示出了微孔过滤后的馏分1、2、3和4。图6示出了微孔过滤后的馏分4、3、2和1。如图5和图6中所示,用氯化钙凝结的情况没有显示出叶绿素的去除相对于对照馏分(馏分2)的明显差异。还如图5和图6中所示,在馏分3和4中使用两种不同的氯化钙浓度没有导致叶绿素去除有明显差异。

[0309] 进一步的实验检查了添加EDTA的点。对于第一组馏分,用磷酸盐(包含磷酸氢二钾和磷酸二氢钾)而不用EDTA处理在使用篮式离心机进行固/液分离后获得的滤液。图7A示出了这些馏分。对于第二组馏分,用磷酸盐(包含磷酸氢二钾和磷酸二氢钾)并用EDTA处理固液分离前获得的裂解液。图7B示出了这些馏分。如图7A和图7B中所示,来自第二组馏分的馏分2与来自第一组馏分的馏分2相比具有完全不同的颜色。在不希望受理论约束的情况下,据认为这些结果表明与向裂解液中添加EDTA相比,向滤液中添加EDTA导致颜色的去除程度更大。

[0310] 实施例6

[0311] 此实施例研究了使用氯化钙凝结叶绿素和/或叶绿体膜,作为使用热浴的替代。

[0312] 在含有0.1M NaCl和2%偏亚硫酸氢盐(不含EDTA)的提取缓冲液中裂解生物质。按下表4中详述的量,向375mL篮式离心后(Rousselet-Robatel型号RA20VxR立式篮式离心机;Robatel Inc,Pittsfield,Massachusetts)滤液中添加氯化钙和磷酸盐(包含磷酸氢二钾和磷酸二氢钾)。

[0313] 表4:示意变量概述

	氯化钙 (mM)	磷酸盐 (mM)	裂解过程中的 pH 值	篮式离心后的 pH 值
馏分 1	0	100	7	7
馏分 2	7.5	10	7	7
馏分 3	30	40	7	7
馏分 4	75	100	7	7
馏分 5	75	0	7	7
馏分 6	75	100	7	7.5
馏分 7	75	100	7.5	7.5

[0316] 将滤液在室温下搅拌15分钟。在氯化钙处理后,取13mL馏分,并将其在台式离心机(Horizon型号614B离心机;Drucker Diagnostics LLC,Port Matilda,Pennsylvania)离

心。测量上清液的颜色和沉淀馏分的重量。图8示出了添加氯化钙和磷酸盐并执行近似5分钟的台式离心后的馏分样品。如图8中所示,馏分4显示出优良的叶绿素去除。还如图8中所示,馏分5含有白色沉淀(含量未知),而上清液相对仍然充满叶绿素。在不希望受理论约束的情况下,结果可能表明磷酸盐是氯化钙在75mM浓度下有效去除叶绿素所必需的。还如图8中所示,馏分6是在pH 7.5值下裂解,与馏分4相比表现出相对较低的叶绿素去除。在不希望受理论约束的情况下,结果可能表明氯化钙在较高pH值下有效性较低。

[0317] 然后,按照标准程序用活性炭(Cabot Norit Americas Inc,Marshall,Texas) (15分钟)和壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glenthams Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK) (5分钟)处理剩余的裂解液。将活性炭-壳聚糖离心,上清液则通过2个咖啡过滤器进一步过滤。记录上清液的颜色。图9示出了去除活性炭和壳聚糖后馏分1-6的样品。如图9中所示,壳聚糖和活性炭在用氯化钙和磷酸盐预处理后功能正常。还如图9中所示,活性炭和壳聚糖的颜色去除在馏分6中最有效,该馏分含有75mM氯化钙和100mM磷酸盐。

[0318] 执行了SDS-PAGE考马斯染色分析,以可视化和测定馏分1、5、6和7中的Rubisco蛋白质水平。图10示出了来自SDS-PAGE考马斯染色分析的结果。图10示出了来自馏分5-7的台式离心后的沉淀和上清液(“Sup”)的SDS-PAGE凝胶(Bio-Rad Laboratories,INC,Hercules,CA)结果。如图10中所示,泳道9显示叶绿素仍附着于约25kDa的蛋白质,而泳道6显示叶绿素是分离的。在不希望受理论约束的情况下,这些结果可能表明,附着于叶绿素的蛋白质具有近似25kDa的(亚基)大小。还如图10中所示,Rubisco大部分在馏分5、6和7的上清液中,而25kDa叶绿素结合蛋白质大部分在沉淀中。在不希望受理论约束的情况下,这些结果可能表明与磷酸盐在一起的氯化钙可选择性地沉淀叶绿素结合蛋白质,并将Rubisco留在溶液中。

[0319] 在不希望受理论约束的情况下,据认为结果表明氯化钙可从篮式离心后的绿色滤液中有效地去除叶绿素和细胞膜,大部分Rubisco留在上清液中,氯化钙诱导的沉淀似乎立即发生,并且氯化钙去除25kDa叶绿素结合蛋白质。

[0320] 实施例7

[0321] 此实施例研究了0.5%洗涤剂对通过过滤裂解液回收蛋白质的影响和洗涤剂对下游工艺步骤的影响。

[0322] 用含0.1M NaCl、0.1M磷酸盐(包含磷酸氢二钾和磷酸二氢钾)和2%偏亚硫酸氢盐的缓冲液裂解4kg生物质(Vitamix Corp,Cleveland,Ohio)。在将2L裂解液与200ml 10% Chaps溶液(Biovision Inc,Milpitas,California)混合以在裂解液中的浓度达到0.5%的浓度后。然后,将此溶液混合约10分钟,并在篮式离心机(Rousselet-Robatel型号RA20VxR立式篮式离心机;Robatel Inc,Pittsfield,Massachusetts)中离心。向剩余的裂解液中添加200mL水,以进行稀释因子校正。

[0323] 对这两个馏分均取出375ml滤液馏分,并加入28.1ml的1M氯化钙缓冲液以达到75mM浓度。将混合物离心,并比较上清液。取出对照上清液,并添加5%的正常壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glenthams Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK)量(添加0.75g壳聚糖至375ml中)。将溶液混合5分钟,然后取出少量13mL样品并在台式离心机(Horizon型号614B离心机;Drucker Diagnostics LLC,Port Matilda,

Pennsylvania) 离心。然后,将上清液的pH值升高至7.2,以检查剩余的壳聚糖和充分的颜色去除。向原始溶液中添加另一份0.75g壳聚糖以达到总计10%的正常壳聚糖(在375mL中添加1.5g)。重复此操作直至颜色去除充分或观察到过量的壳聚糖。此时观察到的壳聚糖%为10%。向这两个馏分中均添加25%的AC和10%的壳聚糖,并用离心机进行离心。

[0324] 图11示出了各个样品的SDS-PAGE凝胶(Bio-Rad Laboratories, INC, Hercules, CA)。如图11中所示,洗涤剂不会明显提高滤液中的Rubisco,并且任一馏分中的活化碳-壳聚糖沉淀中似乎不存在Rubisco。

[0325] 图12示出了去除活化碳和壳聚糖后的馏分。如图12中所示,用Chaps进行的处理导致更多的多酚和/或多酚氧化酶(PP0)在裂解过程中释放出来。

[0326] 在不希望受理论约束的情况下,这些结果可能表明,用Chaps进行的处理没有明显导致更多的Rubisco在裂解过程中释放出来,但用Chaps进行的处理的确导致大量的多酚和/或多酚氧化酶(PP0)在裂解过程中释放出来。还在不希望受理论约束的情况下,这些结果也可能表明,25%活化碳和5%壳聚糖没有明显去除任一馏分的颜色。

[0327] 实施例8

[0328] 此实施例涉及氯化钙基线运行、用0.1%CHAPS再悬浮滤饼和用0.1%CHAPS洗涤第二滤饼。

[0329] 用包含0.2M NaCl、0.1M PO_4 pH 7.7、2%偏亚硫酸氢盐的提取缓冲液(配方组成/kg:20ml 5M NaCl、115ml 1M NaOH、115ml H_2O 、50ml 1M PO_4 缓冲液pH 7.6、200g冰)裂解2kg生物质(Vitamix Corp, Cleveland, Ohio)。最终,将2kg生物质分成三个馏分。对于馏分1,用Vitamix裂解后添加75mM氯化钙,并手动混合10分钟,同时密切观察pH值。然后,用篮式离心机(Rousselet-Robatel型号RA20VxR立式篮式离心机;Robatel Inc, Pittsfield, Massachusetts)对它进行离心,并收集馏分作为滤液。馏分2的制备包括将篮式离心滤饼再悬浮于2L再悬浮缓冲液(70mM PO_4 pH 7.2、0.1M NaCl、0.1%CHAPS)中。然后,将浆料用Vitamix共混1分钟,并通过篮式离心分离滤液(馏分2)和滤饼。与馏分2非常相似,馏分3是通过将篮式离心滤饼再悬浮于1 L再悬浮缓冲液中来制备。手动混合该浆料,并让其静止10分钟,然后进行篮式离心。添加50 g活化碳,混合15分钟,然后加入20 g 3%壳聚糖(壳聚糖(10-120 cps),真菌来源(9012-76-4);Glentham Life Sciences Ltd., Corsham, Wiltshire, UK),每个馏分再混合5分钟。然后,将该溶液离心,并通过0.2 μm 过滤器(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.2 μm ;Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington)来微孔过滤。最后,用50 kDa超滤(MINIKROS® S02-E050-05-N;Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California)浓缩该溶液,并将其渗滤至盐度低于0.1 ppt($\sim 10 \text{ L dH}_2\text{O}$)。最后一步是10 kDa超滤(MINIKROS® S02-E010-05-N;Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, California),然后将其冷冻干燥。表5中提供了对照/滤饼再悬浮/第二洗涤过程中使用的参数。

[0330] 表5:工艺参数

步骤	pH	调节至pH	体积(L)
裂解液	全部为7.1	全部为7.7	3.3/3.0/2.3
含氯化钙的裂解液	6.3	6.8	-
滤液	6.6/6.8/7.1	全部为7.3	2.5/2/1.7

含壳聚糖的滤液	全部为6.8	-	-
---------	--------	---	---

[0332] 在篮式离心后,馏分2和馏分3相对于馏分1具有更深的绿色。然而,在微孔过滤后,馏分3为几乎无色,并且馏分2的颜色比馏分1更浅。图13示出了各种样品的SDS-PAGE凝胶,其中“F1”是指“馏分1”,“F2”是指“馏分2”,“F3”是指“馏分3”,“AC-C”是指“活化碳-壳聚糖”,“sup”是指“上清液”,以及“Rubi”是指“Rubisco”。观察到基于可溶性粗蛋白质的生物质中的总可溶性蛋白质含量的94.25%的收率。

[0333] 实施例9

[0334] 此实施例研究了用氯化钙、升高的磷酸盐和0.25%CHAPS洗涤剂进行处理。

[0335] 处理了总计6kg的生物质 (Vitamix Corp,Cleveland,Ohio)。6kg生物质被分为三个2kg批次以运行三个实验馏分。馏分1是在包含0.2M NaCl、0.1M磷酸盐(包含磷酸氢二钾和磷酸二氢钾) pH 7.7和2%偏亚硫酸氢盐的提取缓冲液(配方组成/kg:20ml 5M NaCl、120ml 1M NaOH、110ml H₂O、50ml 1M磷酸盐缓冲液pH 7.6、200g冰)中裂解。

[0336] 在功率5的条件下通过Vitamix执行裂解3分钟。馏分2是以与馏分1相同的方式裂解;然而,提取缓冲液含有更多的磷酸盐(配方组成/kg:20ml 5M NaCl、120ml 1M NaOH、77ml H₂O、83ml 1M磷酸盐缓冲液pH 7.6、200g冰)。馏分3是在与馏分2相同的磷酸盐缓冲液中裂解,但是添加了最终浓度为0.25%的CHAPS洗涤剂(Biovision Inc,Milpitas, California)。裂解是使用与馏分1和2相同的方案在Vitamix共混机中进行的(观察到一些发泡)。

[0337] 用1M NaOH调节滤液的pH值至pH 7.3,并且不得使其低于pH 6.8。裂解后添加75mM氯化钙,并手动混合10分钟,同时密切观察pH值。然后,用篮式离心机(Rousselet-Robatel 型号RA20VxR立式篮式离心机;Robatel Inc,Pittsfield,Massachusetts)对它进行离心以收集滤液。馏分2的制备由将篮式离心滤饼再悬浮于2L再悬浮缓冲液(70mM PO₄ pH 7.2、0.1M NaCl、0.1%CHAPS)中组成。然后,将浆料用Vitamix共混1分钟,并通过篮式离心分离滤液(馏分2)和滤饼。与馏分2非常相似,馏分3是通过将篮式离心滤饼再悬浮于1L再悬浮缓冲液中来制备。手动混合该浆料并让其静止10分钟,然后进行篮式离心。添加50g活化碳(Cabot Norit Americas Inc,Marshall,Texas),混合15分钟,然后加入20g 3%壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glentham Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK),每个馏分再混合5分钟。然后,将该溶液离心,并通过0.2μm过滤器(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.2μm;Sterlitech Corporation Inc,Kent,Washington)来微孔过滤。最后,将该溶液用50kDa超滤MINIKROS® S02-E050-05-N;Spectrum Laboratories, Inc.,Rancho Dominguez,California)浓缩,并渗滤至盐度低于0.1ppt(~10L dH₂O)。最后一步是10kDa超滤(MINIKROS® S02-E010-05-N;Spectrum Laboratories, Inc.,Rancho Dominguez,California),然后将其冷冻干燥(Harvest Right LLC,Salt Lake City,Utah)。表6中提供了对照/馏分2/馏分3过程中使用的参数。

[0338] 表6:工艺参数

步骤	pH	调节至pH	体积(L)
裂解液	全部为7.1	全部为7.7	3.4/3.4/4.8
含氯化钙的裂解液	6.3	6.8	-

滤液	6.6/6.8/7.1	全部为7.3	2.8/2.5/2.6
含壳聚糖的滤液	全部为6.8	-	-

[0340] 在篮式离心后,馏分2比馏分1略深,馏分3在篮式离心后明显更深绿。在超滤后,馏分2和3相对于馏分1更浑浊。馏分3的体积为4.8L;然而,由于明显升高的空气量使体积膨胀,因此按3.4L进行处理。加工前滤液的体积全部被减少至2.5L。因此,实际上分析了89%的馏分1、100%的馏分2和96%的馏分3。

[0341] 图14示出了各种样品的SDS-PAGE凝胶,其中“F1”是指“馏分1”,“F2”是指“馏分2”,“F3”是指“馏分3”,“AC-C”是指“活性炭-壳聚糖”,以及“sup”是指“上清液”。基于生物质中的总可溶性蛋白质含量的收率如下:对照,80.69%;馏分2:89.43%;馏分3:95.20%。

[0342] 实施例10

[0343] 此实施例研究了在不使用热浴的情况下壳聚糖浓度对叶绿素去除的影响。

[0344] 用包含2%偏亚硫酸氢盐、10mM EDTA和0.1M NaCl的提取缓冲液裂解2kg生物质(Vitamix Corp,Cleveland,Ohio)。然后,从滤液制备五个馏分,全部五个馏分的体积均为375mL。所有馏分均以速度4进行混合,并且对全部馏分进行离心(Allegra X15R,SX4750电机;Beckman Coulter,Inc.,Pasadena,California),步骤均被设置为5200g和5分钟。对于过滤,使用咖啡过滤器,接着用配有涂布有DE(Dicalite Management Group Inc,Bala Cynwyd,Pennsylvania)的0.45μm截止过滤片(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.45μm;Sterlitech Corporation Inc,Kent,Washington)的布氏漏斗。

[0345] 馏分1:然后,向该馏分中添加15g活性炭(Cabot Norit Americas Inc,Marshall,Texas)并混合15分钟。然后,添加15g 1%壳聚糖(壳聚糖(10-120cps),真菌来源(9012-76-4);Glentham Life Sciences Ltd.,Corsham,Wiltshire,UK),并再混合5分钟。然后对溶液进行离心(Allegra X15R,SX4750电机;Beckman Coulter,Inc.,Pasadena,California),然后过滤(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.2μm;Sterlitech Corporation Inc,Kent,Washington)。

[0346] 馏分2:然后,向该馏分中添加15g活性炭,并混合15分钟。之后,添加15g 2%壳聚糖,并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。

[0347] 馏分3:然后,向该馏分中添加15g活性炭,并混合15分钟。之后,添加15g 3%壳聚糖,并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。

[0348] 馏分4:然后,向该馏分中添加15g活性炭,并混合15分钟。之后,添加15g 4%壳聚糖,并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。

[0349] 馏分5:然后,向该馏分中添加15g活性炭,并混合15分钟。之后,添加15g 5%壳聚糖,并再混合5分钟。然后,离心该溶液,接着过滤。然而,犯了一个错误,在添加壳聚糖后没有启动计时器。因此,未将馏分5的结果与其他馏分比较。

[0350] 示意变量概述

[0351] • 壳聚糖范围:从1%至5%

[0352] • 无磷酸盐缓冲剂

[0353] • 15min的100%活性炭混合,然后为5min的壳聚糖混合物。

[0354] 图15示出了用布氏漏斗进行微孔过滤后的馏分1-5。如图15中所示,馏分2、3和4中的颜色似乎被同样好地去除了。在不希望受理论约束的情况下,馏分1和馏分2间的比较表

明,1%壳聚糖不能像2%壳聚糖那样有效地去除叶绿素。如图15中所示,相对于馏分1-4额外暴露于活化和壳聚糖近似2-4分钟的馏分5比馏分1-4更澄清。

[0355] 在不希望受理论约束的情况下,这些结果可能表明,用2%壳聚糖溶液处理的效果与用3%壳聚糖溶液或4%壳聚糖溶液处理的效果近似相同。在不希望受理论约束的情况下,这些结果可能表明,用例如5%壳聚糖溶液和按延长的活化和壳聚糖暴露时间进行的处理也可提高叶绿素去除。

[0356] 实施例11

[0357] 此实施例研究了使用活化膨润土粘土(来自EP工程化粘土的CC160)代替或与活化和(Cabot Norit Americas Inc,Marshall,Texas)联合从壳聚糖后裂解液中除去有色化合物。

[0358] 获得了新鲜的上清液(提取工艺中壳聚糖离心后),并且用NaOH升高其pH值至7.0。用Pierce测定(Pierce™660nm蛋白质测定试剂;Thermo Fisher Scientific,Waltham,Massachusetts)测量光密度,并且测量474nm处的吸光度,以确定[蛋白质]的起始点和橙色变色的量。由于本领域普通技能人员将会理解,Pierce 660nm蛋白质测定试剂可被用于测量总蛋白浓度。在不希望受理论约束的情况下,据认为Pierce 660nm蛋白质测定是基于染料-金属复合物与蛋白质的结合,该结合导致染料的吸收最大值发生位移,该位移可在660nm下测量。该染料-金属复合物为红棕色,并且在蛋白质结合后变为绿色,并且测定中产生的颜色随不断升高的蛋白质浓度成比例增加。向100mL样品中加入0.3%w/v活化和(Cabot Norit Americas Inc,Marshall,Texas)。将混合物搅拌1分钟,之后直接倒入到配有0.45μ过滤器(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.45μm;Sterlitech Corporation Inc,Kent,Washington)以及随后的0.2μ过滤器(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.2μm;Sterlitech Corporation Inc,Kent,Washington)的布氏漏斗中,利用真空收集滤液到烧瓶中。通过Pierce测定测量光密度,并且测量474nm处的吸光度。向单独的100mL样品中加入0.3%w/v CC160粘土。将混合物搅拌1分钟,然后直接倒入到配有0.45μ过滤器以及随后的0.2μ过滤器的布氏漏斗中,利用真空收集滤液到烧瓶中。通过Pierce测定测量光密度,并且测量474nm处的吸光度。

[0359] 使用如表7中所列举的不同浓度的CC160粘土对样品重复上述程序。表7列举了活化和或粘土的浓度和处理和过滤前后在474nm处的吸光度。

[0360] 表7

	活化和(0.3%)	粘土(0.3%)	粘土(1%)	粘土(5%)
[0361] 处理和过滤前在 474 nm 处的吸光度	0.297	0.297	0.297	0.297
处理和过滤后在 474 nm 处的吸光度	0.177	0.403	0.341	0.163

[0362] 在不希望受理论约束的情况下,这些结果可能表明,活化和在去除多酚方面比膨润土粘土更好。

[0363] 实施例12

[0364] 此实施例研究了是否可用树脂替代活性炭。

[0365] 获得了新鲜的上清液(提取工艺中壳聚糖离心后),并且使用NaOH升高其pH值至7.0。通过Pierce测定(PierceTM660nm蛋白质测定试剂;Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)测量起始光密度(“OD”),并且测量474nm处的吸光度(Shimadzu PharmaSpec UV-1700;Shimadzu Scientific Instruments Incorporated, Columbia, Maryland)。向100mL样品中加入0.3%活性炭(Cabot Norit Americas Inc, Marshall, Texas)。将混合物搅拌1分钟,并使其流过布氏漏斗上的0.45μ过滤器(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.45μm;Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington)和随后的0.2μ过滤器(聚醚砜(PES)膜式过滤器,0.2μm;Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington),收集滤液到烧瓶中。收集样品用于光密度测量。向进一步的100mL样品中,按表8中所指示的量(% w/v)加入树脂,并且针对每个样品,将混合物搅拌表8中所指示的时间,然后倾倒该混合物使其从布氏装置上穿过。对每个样品进行光密度测量。

[0366] 表8

	MN200 Purolite 树脂	20%, 2 min	5% , min	53%, 10 min	10%, 5 min	20%, 10 min	5%, 20 min	10%, 2 min	10% , 10 min
		0.697	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697
[0367]	“处理前”上清 液 OD (Pierce)	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697
	树脂结合/过滤 处理后的 OD (Pierce)	0.555	0.617	0.594	0.600	0.578	0.541	0.581	0.579
	“处理前”上清 液 OD (474 nm	0.137	0.168	0.157	0.137	0.102	0.124	0.142	0.112
	处的吸光度)	0.7962	0.88522	0.85222	0.86083	0.8292	0.7761	0.83357	0.83070
[0368]	树脂结合/过滤 处理后的 OD (474 nm)	69727	2381635	3	213773	682926	836441	245337	301291
	处理后 Pierce OD/ 处理前 Pierce OD 的 比率	40315	581	816355	3142	829 27	893 83	15 93	2482
	处理后 橙色 OD (474)/ 处 理前橙色 OD (474)/的比率	0.4448	0.54545	0.50974	0.44480	0.3311	0.4025	0.46103	0.36363
		05194	4545454	0	519480	68	974025	896103	636363
		80519	546	259740	5195	831168	97403	8961	63 64
		5		26		831			

[0369] 该实施例的一个方面是确定当橙色OD最低且同时与蛋白质浓度相关的最高可能Pierce测定读数得以维持时的结合时间和浓度。这一点可从图形上通过Pierce比率线和474比率线之间的最大分离看出。具有最大分离的实验组为20%,持续10分钟,Pierce测定保留了83%的蛋白质,并且橙色减少至33%。

[0370] 实施例13

[0371] 此实施例研究了树脂 (Purolite MN200; Purolite Corporation, Kings of Prussia, Pennsylvania) 与活性炭相比在去除有色化合物方面的有效性。

[0372] 获得了新鲜的上清液 (提取工艺中壳聚糖离心后), 并且使用 NaOH 升高其 pH 值至 7.0。通过 Pierce 测定 (PierceTM 660nm 蛋白质测定试剂; Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) 测量起始光密度 (“OD”), 并且测量 474nm 处的吸光度 (Shimadzu PharmaSpec UV-1700; Shimadzu Scientific Instruments Incorporated, Columbia, Maryland)。向 100mL 样品中加入 0.3% 活性炭 (Cabot Norit Americas Inc, Marshall, Texas)。将混合物搅拌 1 分钟, 使其流过布氏漏斗上的 0.45μm 过滤器 (聚醚砜 (PES) 膜式过滤器, 0.45μm; Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington) 和随后的 0.2μm 过滤器 (聚醚砜 (PES) 膜式过滤器, 0.2μm; Sterlitech Corporation Inc, Kent, Washington), 收集滤液到烧瓶中。收集样品用于光密度测量。向进一步的 100mL 样品中, 按表 9 中所指示的量 (%w/v) 加入树脂, 并且针对每个样品, 将混合物搅拌表 9 中所示时间, 然后倾倒该混合物使其从布氏装置穿过。对每个样品进行光密度测量 (710nm Pierce, 474nm 吸光度)。

[0373] 表 9

[0374]

材料	活性炭(AC) - 细, Sigma				树脂(MN200- Purolite)			
量和驻留时间	0.3%, 10 min	0.5%, 1 min	1%, 1 min	12%, 1 min	20%, 10 min	5%, 20 min	10%, 2 min	10%, 10 min
“处理前”上清液 OD (Pierce)	0.619	0.619	0.619	0.619	0.619	0.619	0.619	0.619
树脂结合/过滤处理后的 OD (Pierce)	0.553	0.518	0.521	0.344	0.466	0.556	0.589	0.576
“处理前”上清液 OD (474 nm 处的吸光度)	0.282	0.282	0.282	0.282	0.282	0.282	0.282	0.282
树脂结合/过滤处理后的 OD (474 nm)	0.243	0.170	0.107	0.068	0.172	0.219	0.226	0.220
处理后 Pierce OD/ 处理前 Pierce OD 的比率	0.89337 641357 0275	0.83683 360258 48 14	0.84168 012924 07 11	0.55573 505654 2811	0.75282 714054 9273	0.89822 294022 6171	0.95153 473344 1034	0.93053 311793 2149
处理后橙色 OD (474) / 处理前橙色 OD 色 (474) 的比率	0.86170 212765 9575	0.60283 687943 2624	0.37943 262411 3475	0.24113 475177 30 5	0.60992 907801 4184	0.77659 574468 08 51	0.80141 843971 6312	0.78014 184397 16 31

[0375] 在不希望受理论约束的情况下, 据认为在 1% 活性炭 1 分钟组中观察到的 Pierce OD 比率和橙色 OD 比率之间的大差异可能是误差, 因为该差异在之前的试验中并未观察到。在不希望受理论约束的情况下, 这些结果可能表明, 活性炭在颜色去除方面比测试的树脂更有效, 但基于 Pierce 测定, 活性炭去除了更多的含氮化合物。

[0376] 实施例 14

[0377] 将最终植物蛋白粉末以10mg/mL的浓度稀释于去离子水中。使用凝胶过滤柱(Superdex 200;GE Healthcare Bio-Sciences Corp,Westborough,Massachusetts)利用快速蛋白液相色谱法(FPLC)来分析样品。随后运行分子量标准品(Bio-Rad Laboratories,INC,Hercules,CA)以接近所关注的样品中单个蛋白质和蛋白质复合物的分子量。图16示出了最终蛋白质产品和蛋白质标准品的色谱图。色谱图蛋白质峰分析显示,关注的蛋白质(Rubisco)从柱中洗脱,其分子量接近但低于670kDa,如通过分子量蛋白质标准品所测量的。

[0378] 实施例15

[0379] 此实施例使用SDS-PAGE电泳来通过考马斯染色使浮萍属植物蛋白质纯度和复杂性可视化。在4-15%SDS-PAGE凝胶(Bio-Rad Laboratories,INC,Hercules,CA)上分析最终纯化蛋白质产品的植物蛋白质提取物的小样品。蛋白质的可视化是通过利用考马斯染料将凝胶中的蛋白质染为蓝色来进行。图17示出了SDS-PAGE凝胶。在不希望受理论约束的情况下,据认为这些结果表明,最终蛋白质制品主要由Rubisco酶组成,并且Rubisco的单个大亚基和小亚基都能在变性和还原条件下很容易地通过SDS-PAGE考马斯染色进行检测。

[0380] 实施例16

[0381] 此实施例研究了叶绿素、多酚和其他光吸收分子的去除,如通过分光光度法进行表征和量化的。在整个纯化过程中通过分光光度计(Shimadzu PharmaSpec UV-1700; Shimadzu Scientific Instruments Incorporated,Columbia,Maryland)对纯化过程的每个步骤的样品进行表征。在1100nm至245nm间扫描样品。图18示出了吸收图谱。馏分1峰(“F1”)对应于从第一个液固分离步骤后的滤液中检测到的信号。馏分4(“F4”)峰对应于0.2 μm微孔过滤后取出的样品。在不希望受理论约束的情况下,据认为从扫描分光光度计检测到的吸收峰表明在整个过程中有效地去除了光吸收分子。

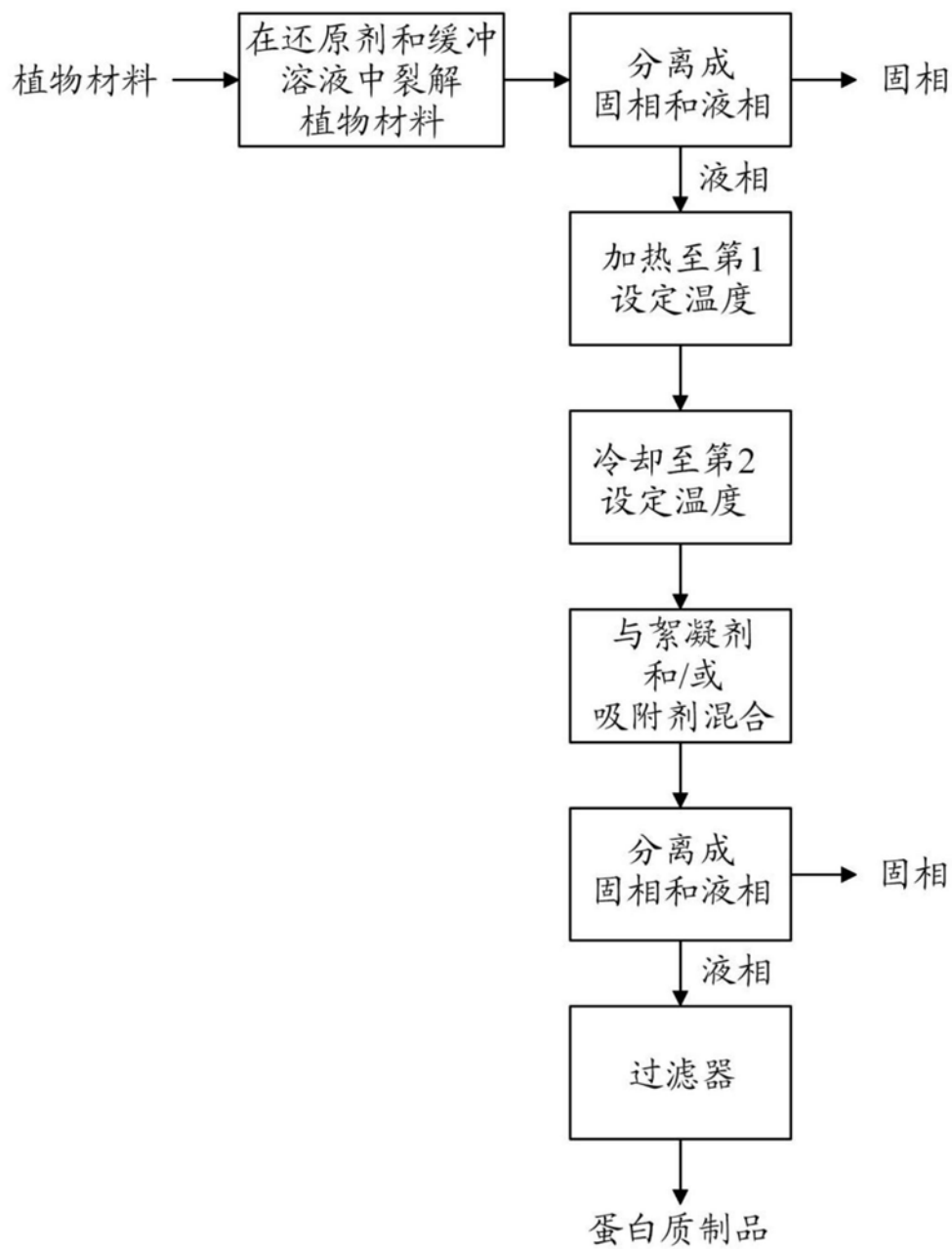


图1

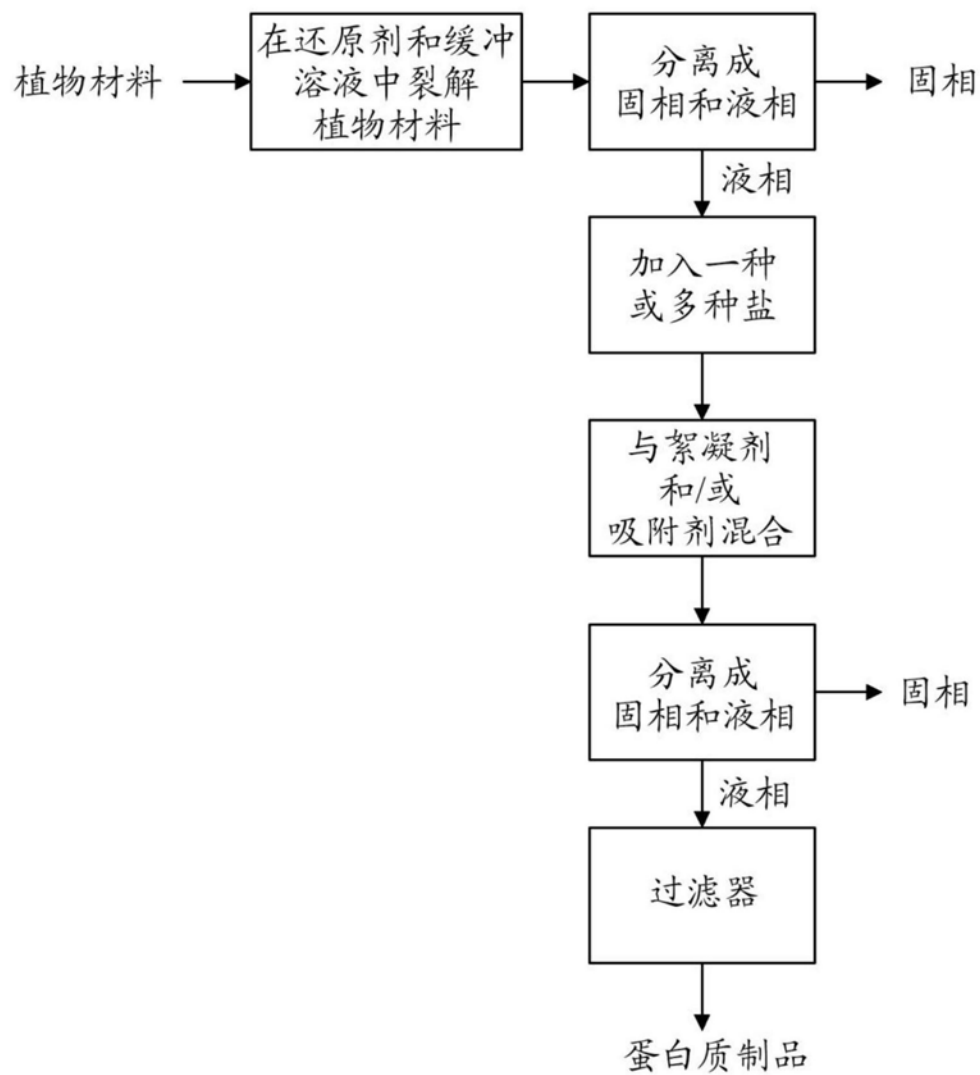


图2

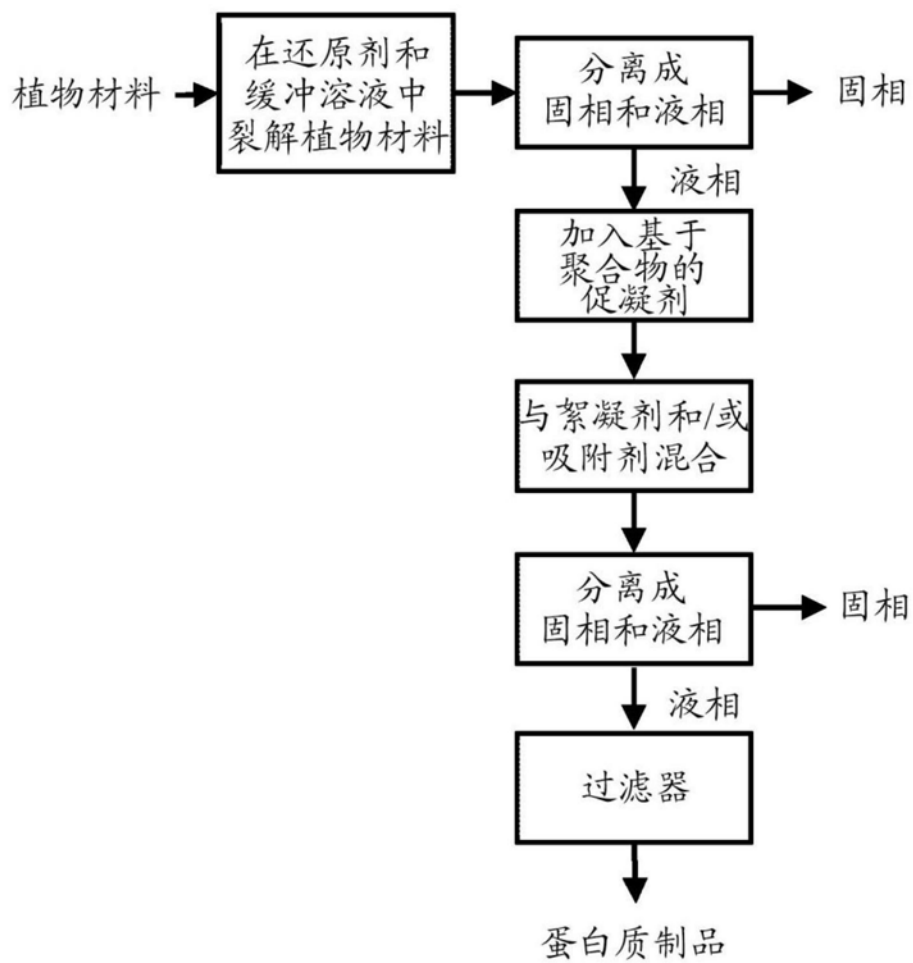


图3

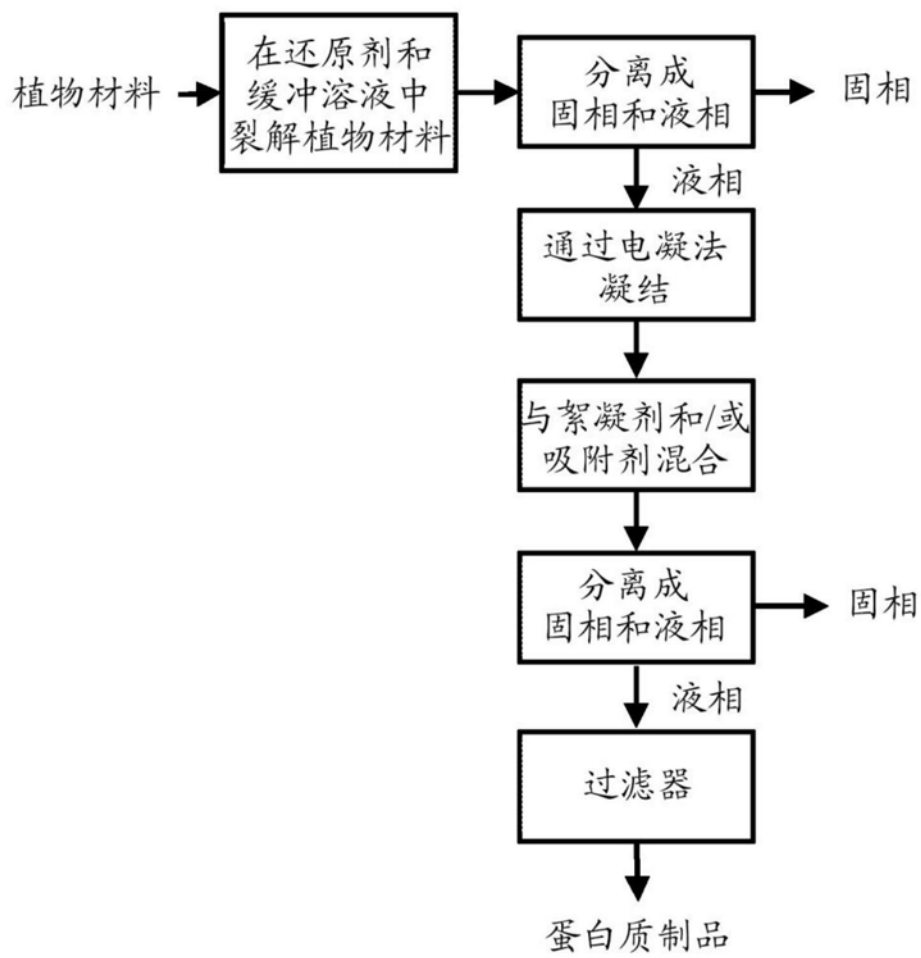


图4

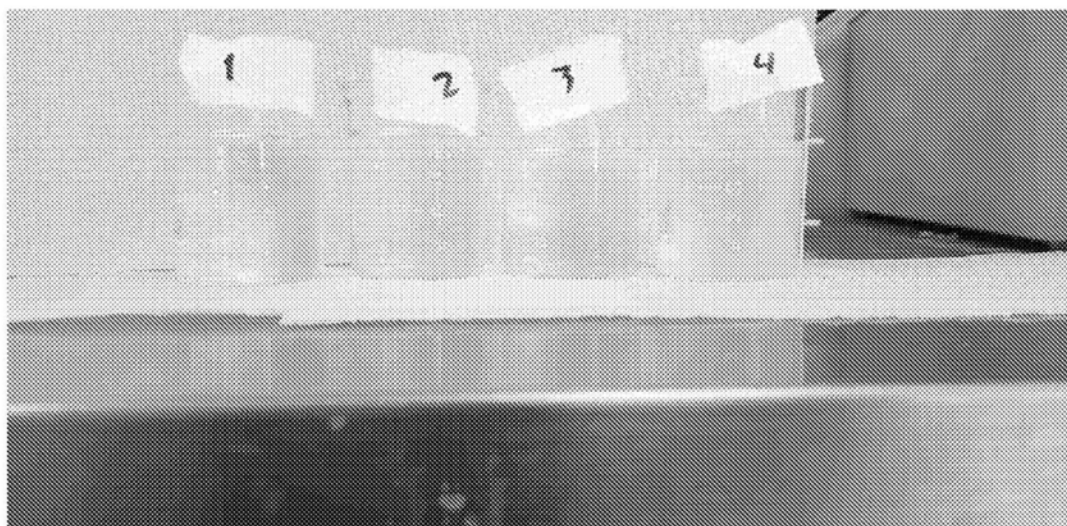


图5

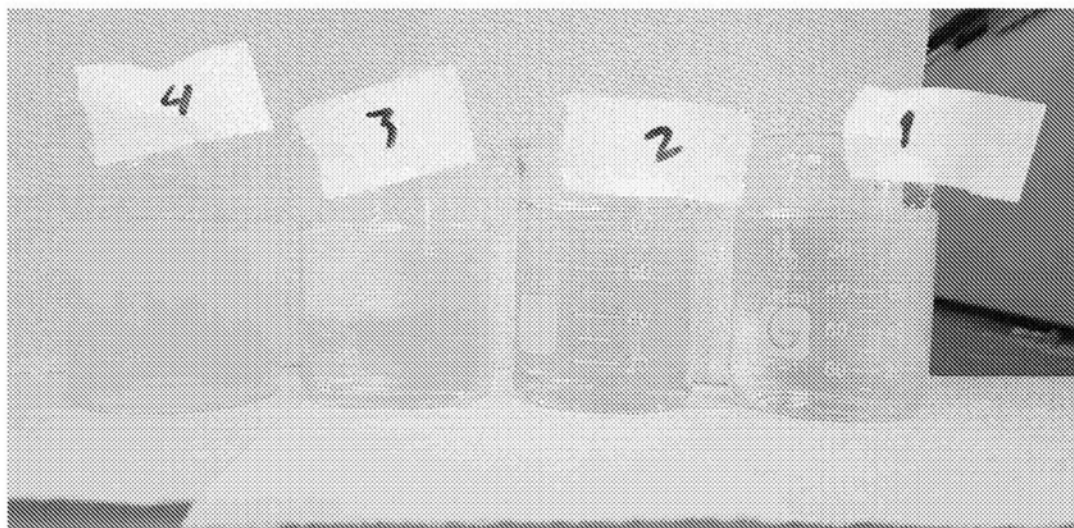


图6

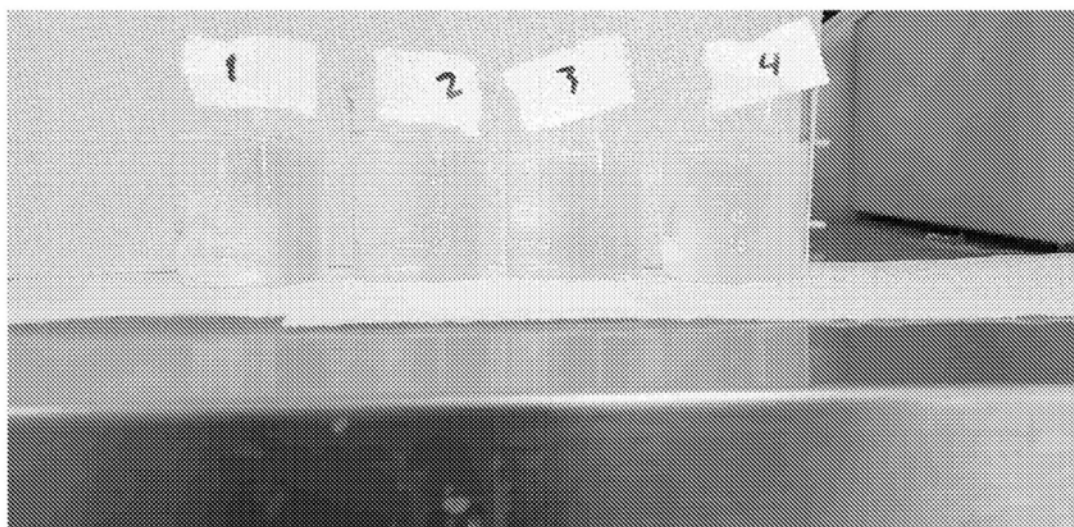


图7A

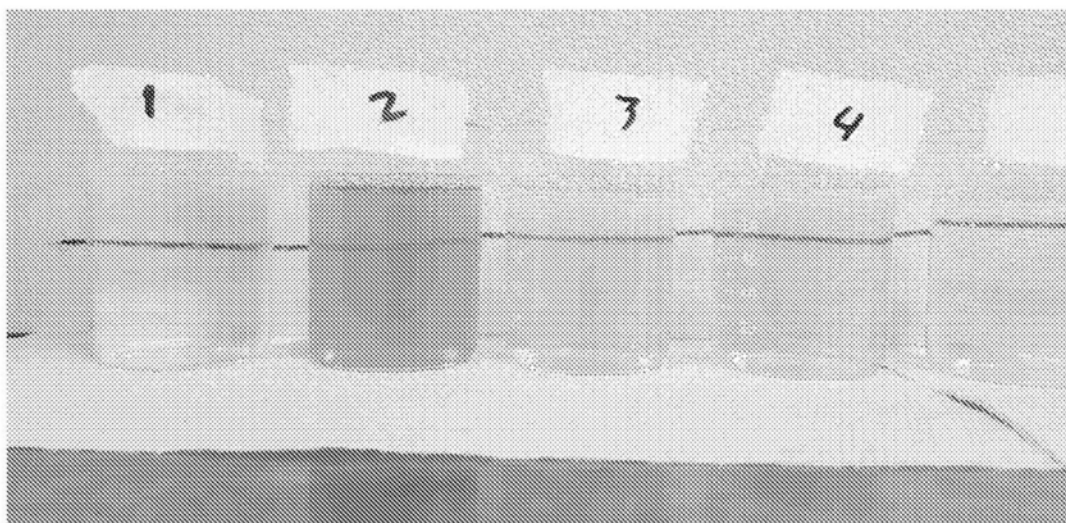


图7B

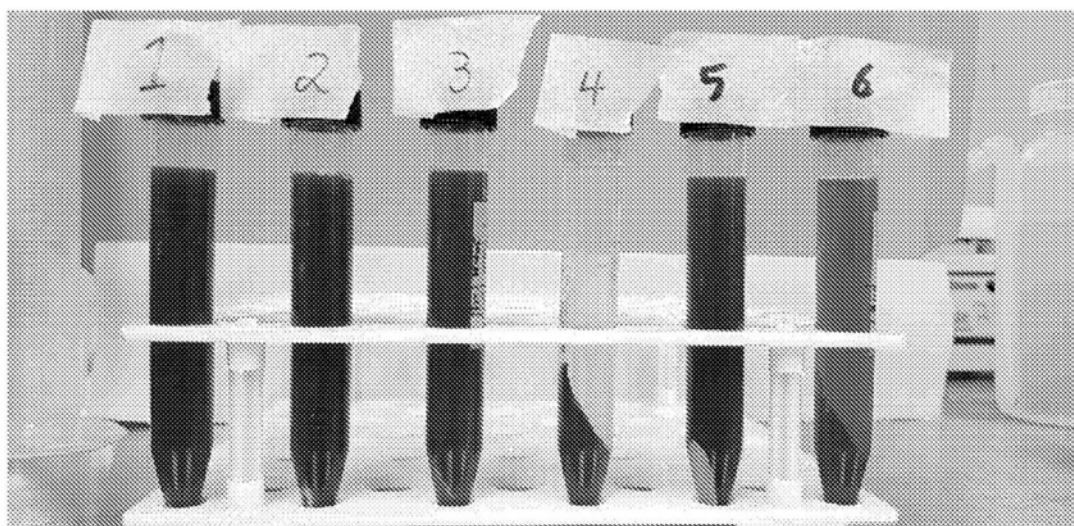


图8

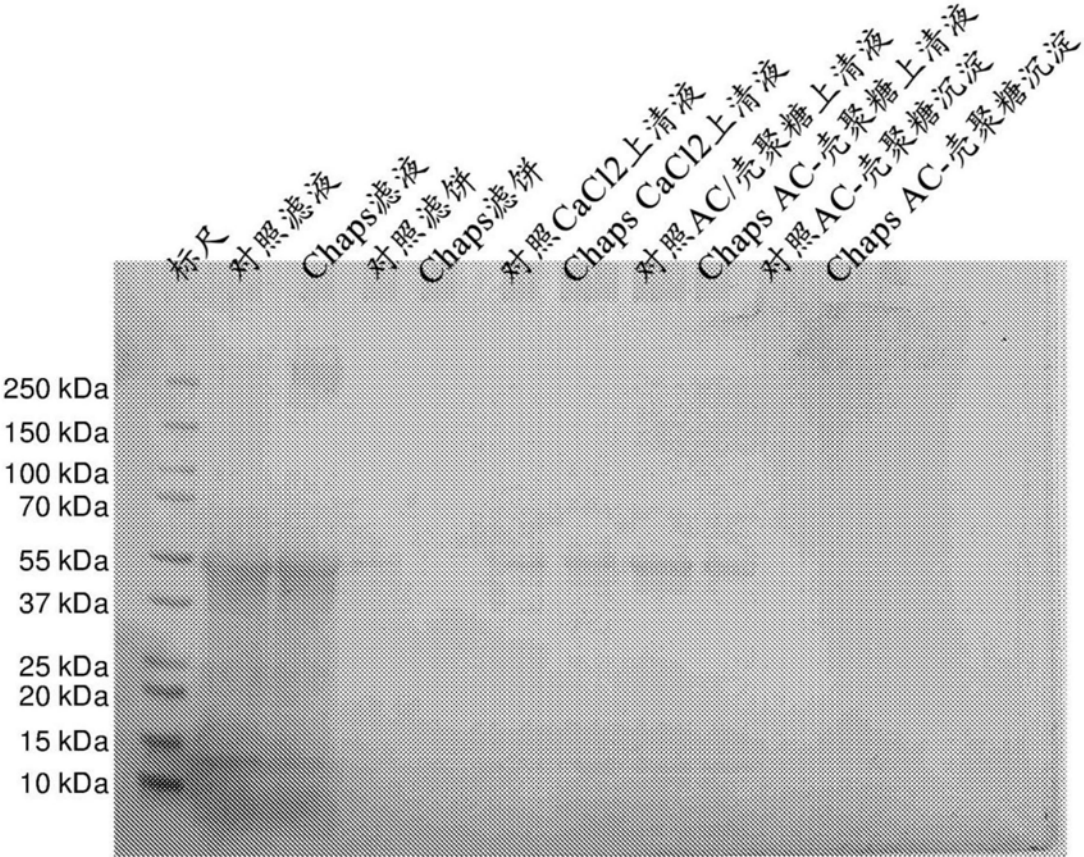


图11

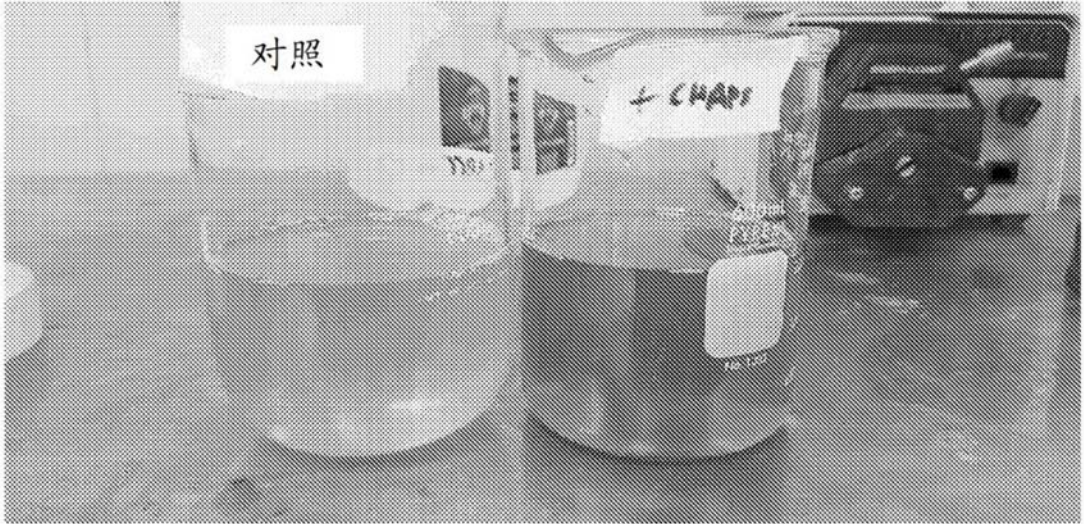


图12

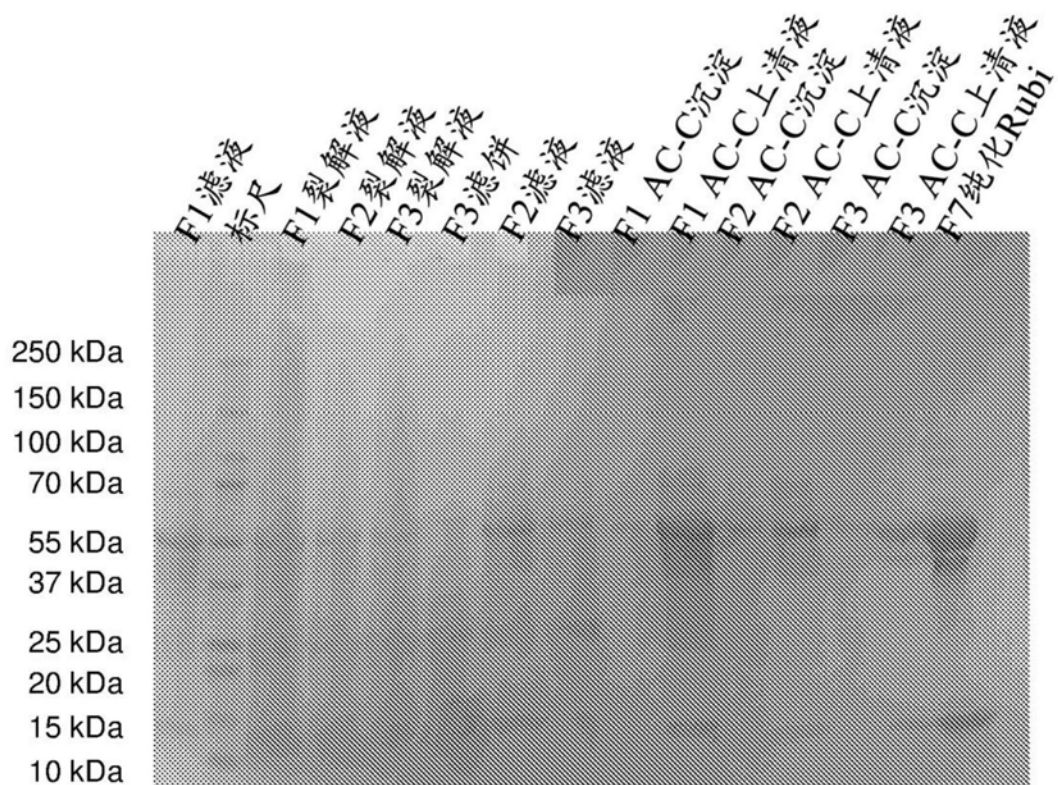


图13

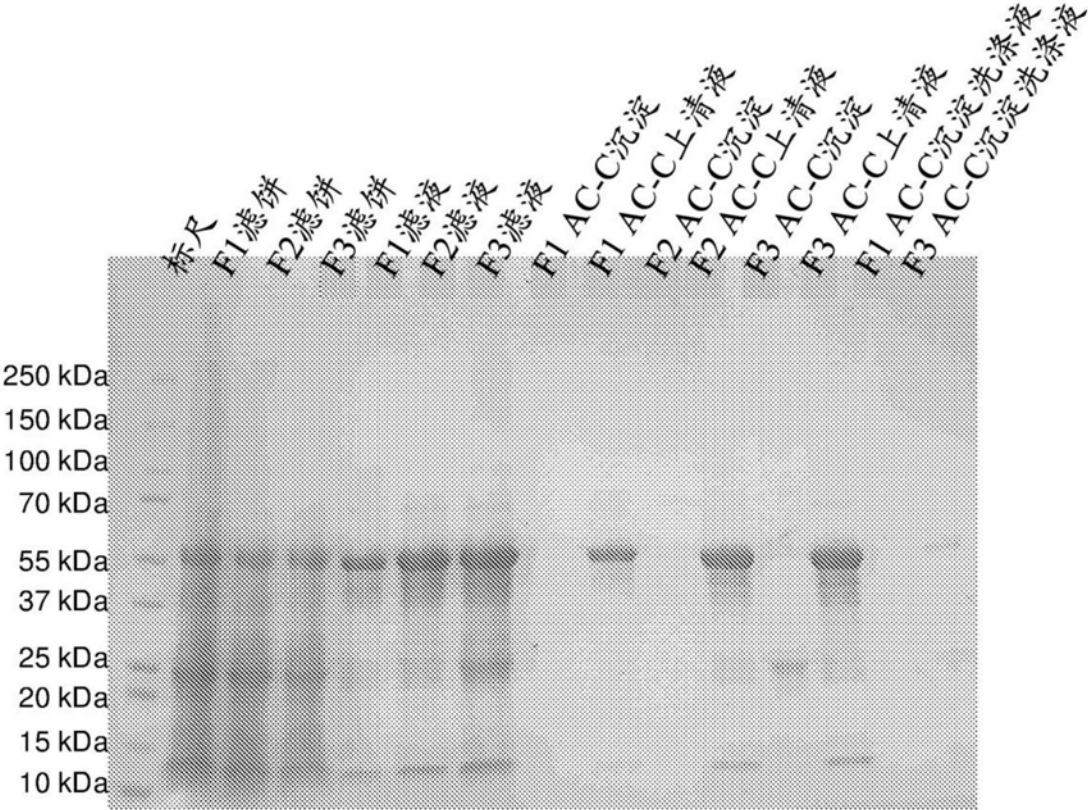


图14

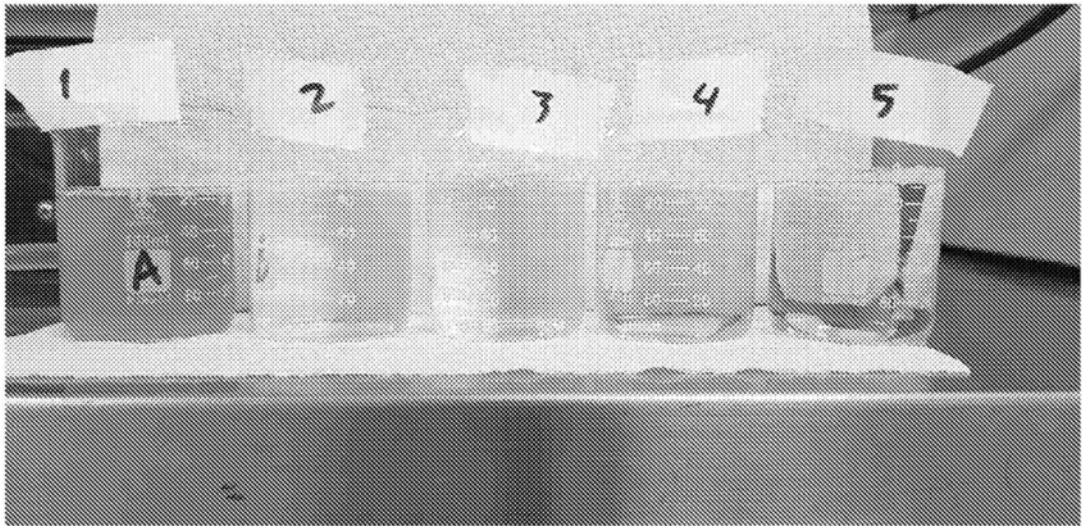


图15

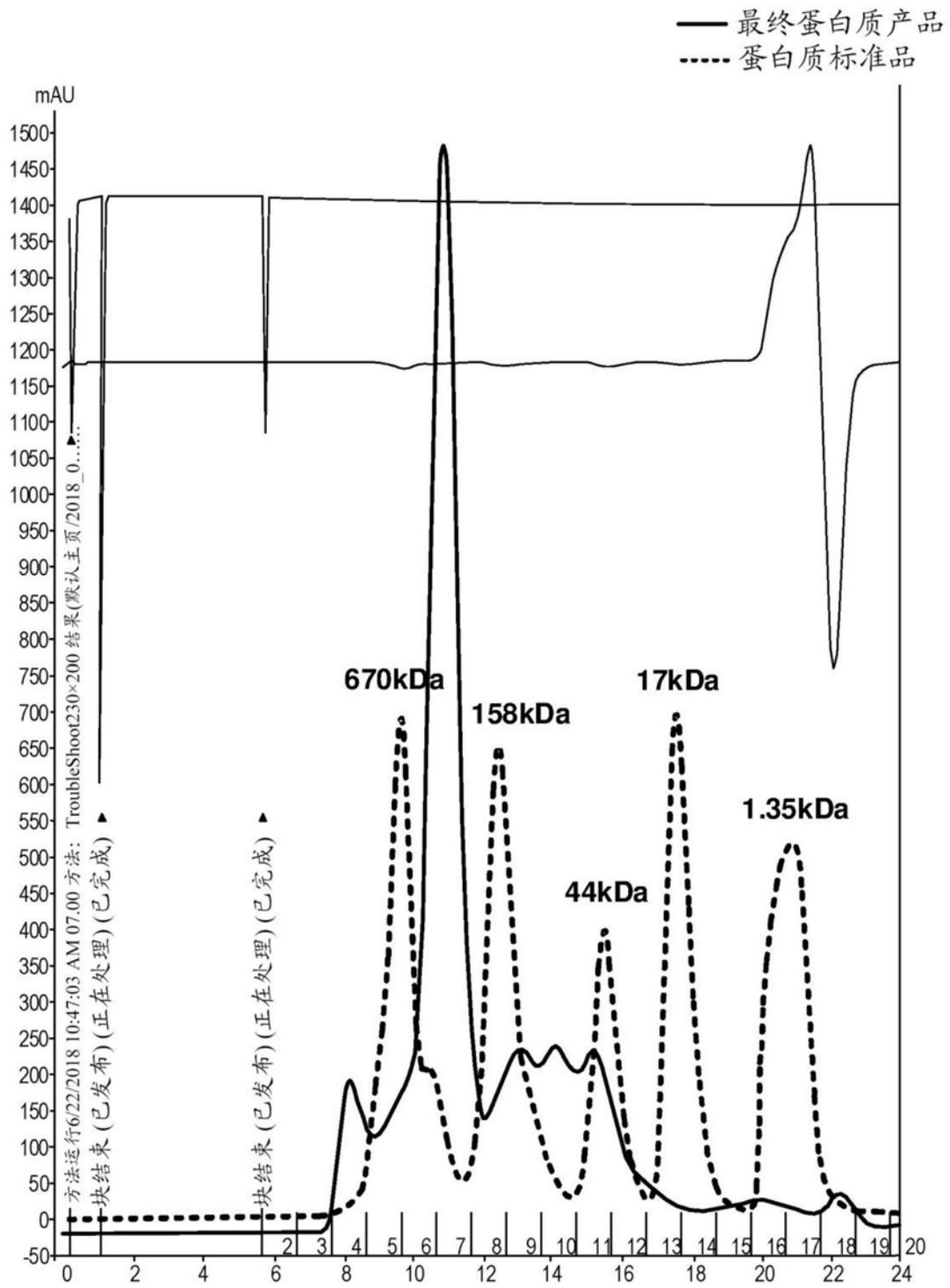


图16

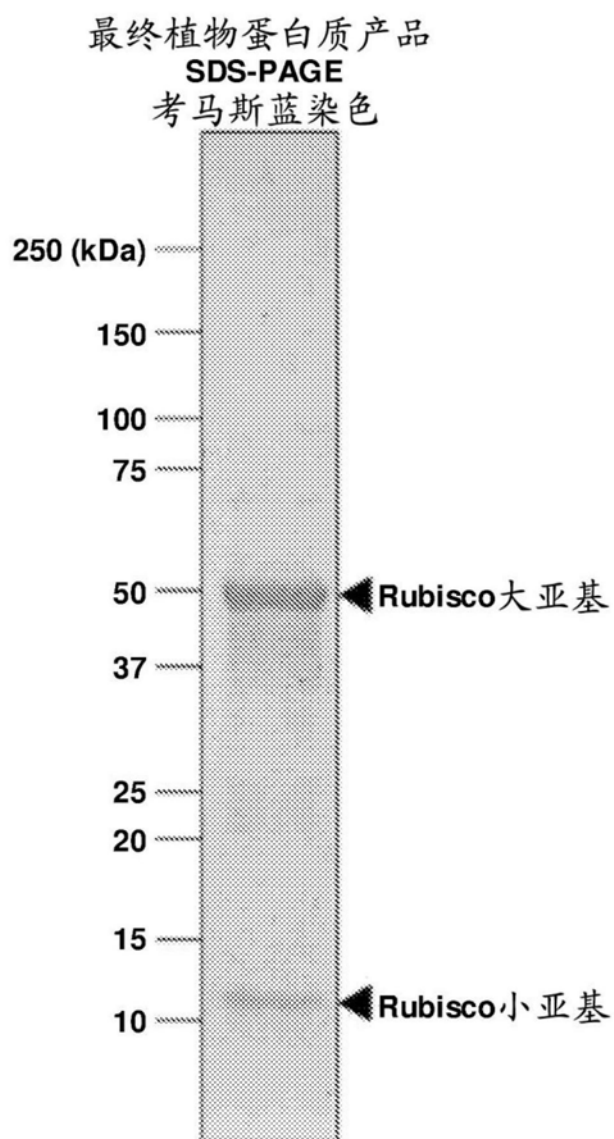


图17

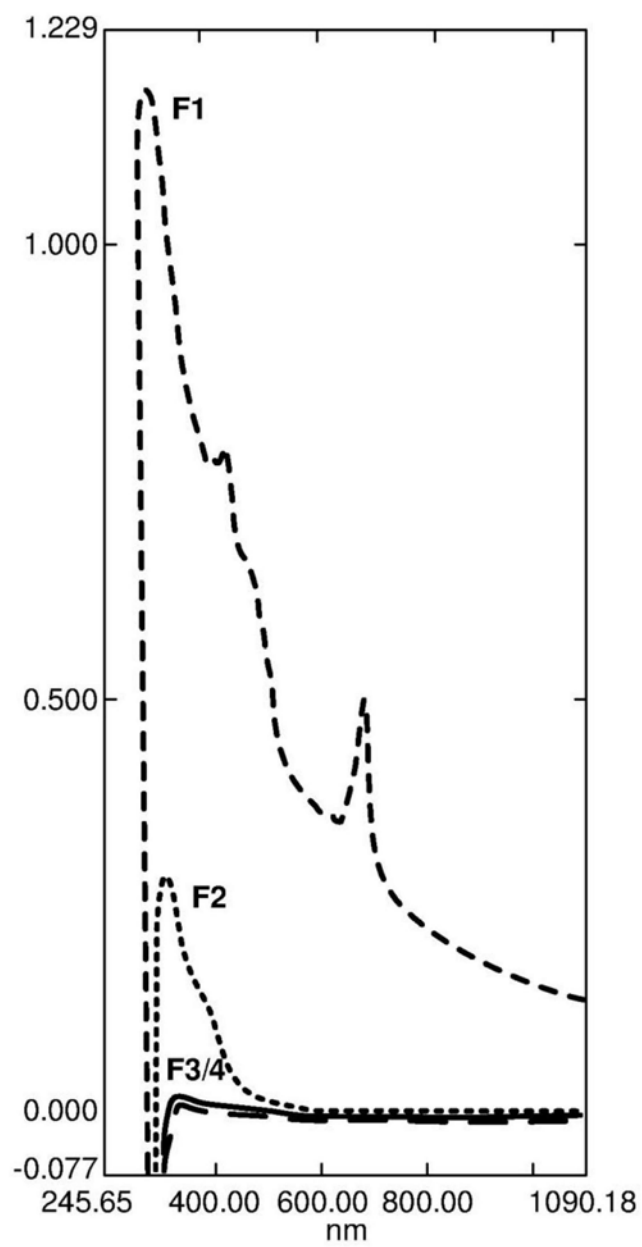


图18