

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3626498号
(P3626498)

(45) 発行日 平成17年3月9日(2005.3.9)

(24) 登録日 平成16年12月10日(2004.12.10)

(51) Int. Cl.⁷

F I

A 2 3 J 1/20

A 2 3 J 1/20

A 2 3 C 21/00

A 2 3 C 21/00

A 2 3 J 3/08

A 2 3 J 3/08

請求項の数 25 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願平7-522158	(73) 特許権者	サボライネン, ジューコ
(86) (22) 出願日	平成7年2月22日(1995.2.22)		フィンランド国, カウニアイネン エフア
(65) 公表番号	特表平9-509320		イエヌーO2700, クーリンニーチュン
(43) 公表日	平成9年9月22日(1997.9.22)		ティエ 26
(86) 国際出願番号	PCT/FI1995/000091	(74) 代理人	弁理士 小野 尚純
(87) 国際公開番号	W01995/022907		
(87) 国際公開日	平成7年8月31日(1995.8.31)	(74) 代理人	弁理士 奥貫 佐知子
審査請求日	平成14年2月19日(2002.2.19)	(72) 発明者	サボライネン, ジューコ
(31) 優先権主張番号	940846		フィンランド国, カウニアイネン エフア
(32) 優先日	平成6年2月23日(1994.2.23)		イエヌーO2700, クーリンニーチュン
(33) 優先権主張国	フィンランド(FI)		ティエ 26
		審査官	内田 淳子
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ホエータンパク質を分離するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) ホエー又はその濃縮物とスルフィットイオンを生成する試薬と酸化剤とを接触させてスルホン酸化物を形成させる亜硫酸化と酸化工程、
b) ホエー又はその濃縮物から亜硫酸化され、酸化されたホエー蛋白質を酸性pH下に析出させる工程、及び
c) 生成混合物から亜硫酸化され、酸化された析出ホエー蛋白質を回収し、必要に応じて後処理を行う工程とから成るホエーから蛋白質を分離するための方法に於いて、
前記工程 a) で使用する酸化剤が実質的に触媒を有しない食品グレードの酸化性化合物であり、使用温度が25～55℃の温度範囲であり、この温度範囲内に於いて前記酸化性化合物が亜硫酸化されたホエー蛋白質と直接反応することを特徴とするホエーから蛋白質を分離するための方法。

【請求項2】

前記工程 a) で使用するホエー濃縮物は、その濃縮率がホエーに対して4～16倍で、そのホエー蛋白質含有量は2～7重量/容量%であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記工程 a) で使用するスルフィットイオン生成試薬がアルカリ金属スルフィット、アルカリ土類金属スルフィット、水素スルフィット及びメタビスルフィットから選ばれた少なくとも1種であることを特徴とする請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

10

20

前記工程 a) に於いて、亜硫酸化混合物中のスルフィットの濃度が0.02～0.20Mの範囲内に入るようなスルフィットイオン生成試薬濃度となっていることを特徴とする請求項 1、2 又は 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記工程 a) で使用する食品グレードの酸化性化合物が食品グレードの過氧化物及び／又はハロゲン化物であることを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

【請求項 6】

前記工程 a) に於いて、食品グレードの酸化性化合物の含有量が $0.01 \cdot 0_{act.} \sim 0.15 \cdot 0_{act.}$ 重量／容量%（ここで $0_{act.}$ は化合物中の活性酸素量を表示する）であることを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

10

【請求項 7】

5.0～8.5のpHで工程 a) を実行することを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

【請求項 8】

30～50℃の温度で工程 a) を実行することを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

【請求項 9】

前記工程 a) が、ホエー蛋白質を亜硫酸化するようにホエー又はその濃縮物をスルフィットイオン生成試薬に接触させるサブ工程a1)、及び、前記亜硫酸化されたホエー蛋白質を酸化するように前記サブ工程a1) で亜硫酸化されたホエー蛋白質を食品グレードの酸化性化合物に接触させるサブ工程a2)、の2つのサブ工程からなることを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

20

【請求項 10】

6.0～7.5のpHでサブ工程a1) を実行することを特徴とする請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

前記サブ工程a1) の亜硫酸化を10～50分間で実行することを特徴とする請求項 9 又は10記載の方法。

【請求項 12】

5.0～7.0のpHでサブ工程a2) を実行することを特徴とする請求項 9 乃至11の何れかに記載の方法。

30

【請求項 13】

前記サブ工程a2) の酸化を15～60分間で実行することを特徴とする請求項 9 乃至12の何れかに記載の方法。

【請求項 14】

前記サブ工程a1) 及びa2) を、25～55℃の範囲でのほぼ同じ温度を使用して実行することを特徴とする請求項 9 ～13の何れかに記載の方法。

【請求項 15】

2.5～6.5のpH値を使用することにより、亜硫酸化され酸化されたホエー蛋白質を工程 b) に於いて析出させることを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

【請求項 16】

40

工程 b) に於いて、25～55℃の温度で析出を実行することを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項 17】

工程 b) に於いて、pH値を前記析出pH値にゆっくりと調節することを特徴とする請求項15又は16記載の方法。

【請求項 18】

工程 a) の亜硫酸化及び酸化から工程 b) の析出までのpH変更時のpH値調節を10～40分間以内に行うことを特徴とする請求項15、16又は17記載の方法。

【請求項 19】

工程 b) のpH調節の後に混合物の攪拌を実行し、該攪拌を10～60分間続けることを特徴と

50

する請求項15～18の何れかに記載の方法。

【請求項20】

少なくとも2つの容器内で交互に工程b)の析出を実行し、一方の反応器を空にし、再充填しながら、他方の反応器で亜硫酸化、酸化及び析出を実行するように前記少なくとも2つの反応器内で交互に工程a)の亜硫酸化及び酸化と工程b)の析出とを実行することを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

【請求項21】

工程b)に於いて析出した、亜硫酸化され、酸化されたホエー蛋白質を工程c)に於いてマイクロ濾過により濃縮し、洗浄することを特徴とする前項までの請求項の何れかに記載の方法。

10

【請求項22】

工程c)のマイクロ濾過の濾液の蛋白質を限外濾過により濃縮し、洗浄し、噴霧乾燥により分離することを特徴とする請求項21記載の方法。

【請求項23】

工程c)に於いて、遠心分離法又はバンド状又はドラム状フィルターでの濾過により析出濃縮物から水を除去し、蛋白質ペーストを得ることを特徴とする請求項21又は22記載の方法。

【請求項24】

工程c)に於いて、NaOH又はNaOHとCa(OH)₂とKOHの混合物である塩基又は塩基混合物により前記蛋白質ペーストのpHを6～8の値に上げるに際し、そのCa(OH)₂量が少なくとも元のCa量に戻るように行われることを特徴とする請求項23記載の方法。

20

【請求項25】

工程c)に於いて、噴霧乾燥により析出濃縮物を乾燥し、請求項24に記載の塩基又は塩基混合物により乾燥前の析出濃縮物のpHが6～8の値に調節されていることを特徴とする請求項21記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、a)ホエーまたはその濃縮物とスルフィットイオンを生成する試薬と酸化剤とを接触させてスルホン酸塩を形成し、すなわち亜硫酸化及び酸化を行ない、b)ホエーまたはその濃縮物から亜硫酸化され、酸化されたホエータンパク質を酸性pHで析出し、c)生成混合物から亜硫酸化され、かつ酸化された析出ホエータンパク質を回収し、必要により後処理を行う、ホエーからタンパク質を分離するための方法に関する。

30

ホエータンパク質は全体に栄養価、特にそのリジンおよびメチオニンの含有量の点で他の食品タンパク質よりも優れている。ホエータンパク質を回収し、それを人の食品に使用することによってチーズ製品のコストも低減される。人の食料にホエータンパク質を使用することには潜在的な将来性があるが、これを使用する主たる障害としては現在のところ、1)その回収プロセスのコストが高いことおよび、2)濃縮物または分離物の作用上の性質すなわち可溶性、乳化性、ゲル生成能力および発泡能力が低いことが挙げられる。

ホエータンパク質の分離は可溶性が高いことにより複雑であり、タンパク質が本来の形態となっている間、pH2～9の範囲内にpHを調節しても分離には影響を与えることはできない。ホエータンパク質の分離は次の4つの主な方法、1)変性および析出、2)限外濾過、3)イオン交換および4)化学的変性および析出によって行われる。

40

ホエータンパク質の分離で最も一般に知られている方法は変性化方法、すなわちpHを酸性側に下げながら加熱する方法である。この分離方法は例えば次のように経済的に行うことが可能である。すなわち乾燥物質含有量が約20%となるようにホエーを濃縮し、pHを6.0～7.0の範囲まで調節し、10～30分の間90℃よりも高い温度に維持することによりタンパク質を変性し、その後、pHを4.4～5.0まで低下することによりタンパク質を析出する。この結果得られるタンパク質は最も重要な作用上の性質のほとんどすべてを失う。このようなタンパク質は主に種々のスプレッド、すなわちチーズの一部または全体と置換するためのプロセスチーズとして使用される。Can Int.Food Sci.Technol.J.15(1982年)155～160頁のヒル外による論文を参照のこと。

50

現在ではホエータンパク質は限外濾過または乾燥によりタンパク質濃縮物として、またはイオン交換吸着技術を使用し、乾燥によりタンパク質分離物として主に分離されている。いずれの方法によっても機能的な形態にある分離されたタンパク質を得ることが可能である。優劣のないこれら製造方法のいずれを選択するかを決定的な要素は製品の機能性および製造コストにある。

タンパク質濃縮物の組成、機能性および官能的性質のばらつきは大きいので、業界はこれらの方法を使用することを避けている。このようなばらつきはホエーの組成が異なること、および予処理および調整ならびに処理条件が異なることに起因する。

上記の理由からタンパク質分離物にも種々の性質にばらつきがある。その調製に用いるイオン交換吸着法ではバラツキはある程度均一化され、蛋白質濃縮物とは組成の異なる最終製品を生じる。 10

3種類のホエータンパク質分離物および8種類の濃縮物に関する、モールおよびフェーゲディング共著刊行物、すなわちFood Technol.44 (1990年) 100~112頁に記載の物質の分析によれば、それらの組成は明らかに異なっていることが判った。濃縮物および分離物の平均値はそれぞれ次のとおりであった。すなわちタンパク質濃縮物73.8%および91.0%、非タンパク質窒素3.10%および0.32%、水分5.13%および3.75%、灰分4.27%および1.82%、ラクトース3.92%および0.57%、および脂肪5.00%および0.57%であった。

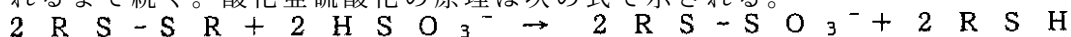
同じ刊行物によれば、分離物は明らかに脂肪およびタンパク質の量、およびタンパク質の可溶性、発泡能力および泡の安定性、およびタンパク質の不変性および粒状性、および食味および匂いの点で、濃縮物よりも高品質で明らかに機能的であった。濃縮物はラクトースおよびミネラル含有量が比較的高く、食味および匂いが悪いという理由から食品業界で濃縮物の使用が制限される理由であった。 20

ホエータンパク質の分離物の良好な性質および利用性は製造プロセスに起因するかなり高い価格により制限されている。

化学的反応によりタンパク質の構造を変えることにより、分子の電荷、その空間的構造、よってその他の所定の性質、例えば可溶性、粘性、発泡性および部分的には乳化性に影響を与えることが可能である。

タンパク質分子の構造を変えるための最も実際的で簡単な化学的方法は、酸化亜硫酸化、すなわち亜硫酸化と酸化である。ここでスルフィットイオンを添加することにより酸化還元反応が開始すると、硫黄の結合、すなわちタンパク質のアミノ酸鎖の間のジスルフィド結合が開く。この反応では1つの硫黄が酸化してスルホン化し、他方の硫黄が還元されてスルホヒドリル基となる。 30

酸化要因も加えると遊離スルホヒドリル基が再び酸化されて、ジスルフィド結合を生じ、この反応はスルホヒドリル基のすべてがスルホン化するか、反応の他のある要因が制限されるまで続く。酸化亜硫酸化の原理は次の式で示される。



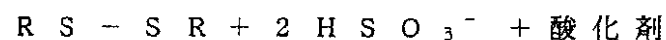
亜硫酸化



40

酸化

.....



総合的反応

ここで、RS-SRは2つのアミノ酸鎖から成るタンパク質分子を示し、S-Sはアミノ酸鎖 50

をリンクし、部分的にこれらアミノ酸鎖を所定の位置に固定した状態に維持する2つのアミノ酸鎖の間のジスルフィド結合である。亜硫酸化時のpHから3～5のpHにpHを下げることで、溶液から変性されたタンパク質分子を析出できる。

ケラ・N.K.D.外によるJ.Agr.Food Chem、37(1989年)1203～1210頁の刊行物では、ホエータンパク質の機能的性質、例えば可溶性、粘性、発泡性および泡安定性に影響を与えると共に、ホエータンパク質分離物の分子を変性するために酸化亜硫酸化を使用していた。これら性質に影響する要因として、元のジスルフィド結合の総数に比例してジスルフィド結合が減少することが挙げられている。ジスルフィド結合の数が減少するにつれて所定の性質が改善されたり、または劣化した。例えばジスルフィド結合の25%が消滅しても、可溶性は5%までに低下し、同時に可溶性の最小値とpH曲線は次のように変化した。すなわち10

25%—pH4.75;50%—pH4.38;75%—pH4.2および100%—pH4.0
変性反応において、タンパク質分離物の濃度は1.0%であり、スルフィットの濃度は0.1Mであり、尿素の濃度は4Mであり、pHは7.0であり、温度は25℃であった。使用した酸化剤は溶液を通して吹き付けた酸素であり、使用した触媒は800mMの濃度まで溶解させたCuSO₄であった。硫酸アンモニウムによる析出により、異なる程度に変性されたタンパク質分離物を分離した。この硫酸アンモニウムは50%飽和状態となる量で溶液に加えた。タンパク質の分離において、変化した可溶性の性質は利用しなかった。

ゴンザレス・J.M.、ダモダラン・D.によるFood Sci.、55(1990年)第6号、1559～1563頁の文献には、上記とほぼ同じ実験条件で、すなわちpH7.0、スルフィット濃度0.1M、温度25℃、酸素を酸化剤とし、本例ではガラスコラム内にバックされた固体ビーズ状をしたCuCO₃のようなCu⁺⁺イオンを触媒とする条件で、約0.6%の含有量のタンパク質を有する未処理のスイートホエーからタンパク質を分離するため、酸化亜硫酸化を使用している。この亜硫酸化生成物を、ビーズで満たされた前記コラム内に循環させることにより、この亜硫酸化生成物を酸化し、スルホン酸塩誘導体とした。その後、遠心分離により液体反応混合物からビーズ残留物を除いた、銅によりキレート化されたスルホン化タンパク質をpH4.5で析出することにより機能的な形態で分離した。しかしながら析出前はEDTA処理によりスルホン化されたホエータンパク質にキレート化した銅を除く必要があった。この場合、研究室規模の実施はめんどろで、かつ複雑であり、先の論文のように高価な装置および試薬を必要とした。酸素の可溶性、従ってその濃度が低下するため、高温の加速効果を利用30

することはできない。塩も溶液中の酸素濃度を低下する。
これまで長い間、多数の方法を利用することにより機能的な製品としてホエータンパク質を経済的に分離しようとする試みがなされたが、上記システムは多くの理由から欠陥があった。

酸化亜硫酸化に基づく上記応用例は分離方法を提供することを目的とするものでもないし、また所定の特性を改善する方法を提供せんとするものでもない。すなわちこれまで開示された方法は工業的な規模で利用するのが困難であるので、実現できなかった。

本発明の目的は最大限経済的で、かつ簡単な、ホエータンパク質を分離するための方法を提供することにある。更に本発明は、最大限機能的な、すなわち乳化でき、ゲル生成可能であり、発泡可能なタンパク質を製造するホエータンパク質分離方法を提供せんとするものである。更に別の目的は、最大限健康的で魅力的であり、人の食料に適したホエータンパク質を調製する方法にある。40

本発明はタンパク質の所望の組成を得る方法を提供することも目的とする。

これら目的は、請求項1の特徴項に記載の事項を主に特徴とするホエータンパク質を分離するための新規な方法により達成された。

従って、本発明ではホエータンパク質を亜硫酸化し、酸化し、析出する方法において、実質的に触媒を使用することなく食品グレードの酸化性化合物を使用し、この酸化性化合物が直接亜硫酸化されたホエータンパク質と反応する25～55℃の範囲内の温度を使用することが有利であることが認識された。

よって、反応を加速し、反応平衡状態を生成物側にシフトさせ、食品グレードの酸化剤を50

使用できるようにする目的のためには、従来用いられた温度よりも高温の温度を使用することが有利である。また、酸化剤として欠陥となり得る致命的な二次反応を生じることなく、使用条件で最適に機能する食品グレードの試薬を使用することが有利である。この点に関し、本発明は高温を使用せず、酸化剤に加えて反応混合物および完成した目的製品の双方から除去しなければならない触媒も使用しなければならない、ゴンザレス外の上記方法とは、その利点が異なっている。

本発明に係わる方法で使用される初期物質はチーズ製品から得られたホエーまたはその濃縮物のいずれかである。工程 a) の亜硫酸化および酸化で使用される原材料としては、ホエーに対し 4 倍～16 倍濃縮された、ホエータンパク質濃度約 2～7 重量／容量%のホエー濃縮物が好ましい。分離されるタンパク質収量を改善し、プロセス中で必要な試薬の量を低減するため、除去される水の量が最小で約 75 重量%となるようにホエーを濃縮することが好ましい。

10

本発明ではホエーまたはその濃縮物のタンパク質はスルフィットイオンを生成する試薬と反応させられる。使用するスルフィット生成試薬はスルフィットイオンを生成するものであれば、化学で公知となっている任意の試薬でよい。一実施態様によればスルフィットイオンを生成する試薬としてスルフィット、水素スルフィットおよび／またはメタバイスルフィットがある。この場合、当該塩の陽イオン成分は任意の塩の陽イオン、例えばアンモニウムまたは元素周期率表の 1～4 族のうちの金属、例えばアルカリ金属またはアルカリ土類金属でよい。スルフィットを生成する試薬としてアルカリ金属スルフィットまたはアルカリ土類金属スルフィット、水素スルフィットおよび／またはメタビスルフィット、最も好ましくはナトリウムスルフィット、ナトリウム水素スルフィットおよび／またはナトリウムメタビスルフィットを使用することが好ましい。本発明に係わる方法で、ナトリウム水素スルフィットを使用した場合最良の結果が得られることを、我々は発見した。

20

ホエータンパク質におけるジスルフィド結合の数に対するスルフィットの量の比率を決定することにより、製造プロセスの亜硫酸化における目的製品機能的性質およびその他の性質に影響を与えることが可能である。ホエータンパク質の亜硫酸化に必要なスルフィット量を計算する代表的な方法は、本明細書において参考例として引用する上記ゴンザレス・J.M.およびダモダラン・S.による J.Food Sci., 55 (1990年)、1559～1563 頁の刊行物に記載されている。一実施態様によれば、工程 a) の亜硫酸化におけるスルフィット生成試薬の濃度は亜硫酸化混合物におけるスルフィット濃度が約 0.02～0.20M、好ましくは 0.05～0.10M の範囲となるような値となっている。

30

従って、この方法の工程 a) ではホエーまたはその濃縮物のタンパク質をスルホン化、すなわち亜硫酸化し、酸化する。使用する酸化剤は、本発明によれば食品グレードの酸化性化合物であり、温度はこの酸化性化合物が亜硫酸化されたホエータンパク質と瞬間的かつ直接反応する温度となっている。当技術分野では、例えば食品およびその中間物の漂白、熟成および湿潤化から多数の食品グレードの酸化剤が知られている。文献では、例えば種々の酵素、例えばアスペルギルス フレイブスーオリゼ酵素、有機過酸化化物、例えば過酸化アセトンおよび過酸化ベンゾイル、無機過酸化化物およびペルオキシ塩、例えば過酸化硫酸アンモニウム、過酸化硫酸カリウムおよび過酸化カルシウム、無毒アゾ化合物、例えばアゾジカーボンアミド (ADA)、塩化ニトロシル、L システイン、ハロジネート、例えば臭素酸カリウム、臭素酸塩とヨウ素酸塩の混合物およびヨウ素酸カルシウムまたはヨウ素カリウムが記載されている。食品グレードの酸化剤としてこれまでカルシウムステアロイル 2-ラクチレートのような化合物および塩素、純粋酸素およびアスコルビン酸も使用されていた。本発明の工程 a) における食品グレードの酸化化合物として、食品グレードの過酸化化合物および／またはハロジネート、好ましくはそれぞれ過酸化カルシウム CaO_2 および／または臭素酸カリウム KBrO_3 を使用することが好ましい。食品グレードの酸化性化合物の好ましい濃度は約 $0.01 \cdot 0_{\text{act}}$ ～ $0.15 \cdot 0_{\text{act}}$ 重量／容量%の範囲であり、ここで 0_{act} は化合物中の活性酸素の濃度を示す。

40

本発明に係わる方法を最適にするため、適当な反応温度、析出で使用するべき pH および pH 調節で使用するべき酸および塩基のみならず、タンパク質ペーストまたは噴霧乾燥粉末となり

50

得る製品に対し所望する性質を得るための適当な手順および方法を決定することも必要である。

好ましい1つの実施態様によれば、工程a)の亜硫酸化および酸化温度は約30~50℃である。亜硫酸化および酸化が生じる好ましいpHは約5.0~8.5の範囲内にある。本発明の好ましい実施態様によれば、a₁)ホエータンパク質を亜硫酸化するようにスルフィットイオンを生成する試薬にホエーまたはその濃縮物に接触させ、a₂)工程a₁)からの亜硫酸化したホエータンパク質を食品グレードの酸化剤化合物と接触させ、亜硫酸化したホエータンパク質を酸化するように、2つのサブ工程で工程a)の亜硫酸化および酸化を実行する。この場合、サブ工程a₁)は約6.0~7.5のpH、最も好ましくは6.5~7.0のpHで実行することが好ましく、この場合、反応時間は約10~50分であることが好ましい。サブ工程a₂)は約5.0~7.0のpH、最も好ましくは約5.5~6.5のpHで実行することが好ましく、この場合、反応時間は約15~60分であることが好ましい。工程a₁)およびa₂)では同じ温度、すなわち上記工程a)の温度を使用することが好ましい。

上記要因により、目的製品の機能的性質およびその他の性質のみならず、析出したタンパク質収量およびホエー中に存在する異なるタンパク質、析出物および濾液におけるβ-ラクトグロブリン、α-ラクトアルブミンおよびボビン血清アルブミン(BSA)の比率に影響を与えることが可能である。

本発明に係わる方法では、まずホエーまたはその濃縮物を亜硫酸化し、酸化し、その後、この亜硫酸化し、酸化したホエータンパク質を酸性pHでホエーまたはその濃縮物の反応混合物から析出する。析出工程b)は約2.5~6.5のpH値、最も好ましくは3.0~5.0のpH値を使用することにより実行することが好ましい。この場合、亜硫酸化され、酸化されたホエータンパク質が析出し、pHは明らかに酸性側にあり、温度は十分高く、好ましくは25~55℃の範囲内にあることが好ましく、最も好ましくは30~50℃の範囲内にあり、二酸化硫黄の状態をした、亜硫酸化および酸化で生じたスルホン基の除去が付加的に行われ、この二酸化硫黄は亜硫酸化で再使用するため受け入れコンテナへ向けられる。従って、亜硫酸化の二酸化硫黄が回収され、プロセスは環境に負担を与えない。

本方法の析出工程b)では、析出のためにpH値を上記pH値に低速で調節することが好ましい。特に工程a)の亜硫酸化および酸化から工程b)の析出へ変更する際にpHの調節を10~40分の間で行うことが特に好ましい。一般に、工程b)のpHの調節後混合物の攪拌を行うが、この攪拌は10~60分の間行うことが好ましい。

分離プロセスにおいて、スルホン化および析出工程b)において連続処理を行う場合、遅延が生じる傾向がある。いわゆる代替処理を使用することにより容易に加速を行うことができる。この場合、一方の反応器でスルホン化および析出を行う間、他方の反応器を空にし、再充填できる。

本発明に係わる方法では、食品グレードの酸化試薬を使用することにより酸化亜硫酸化を行い、これにより生じる反応を化学的量および外的条件、例えばpH、温度および反応時間により調節でき、目的製品が食味、栄養的質、機能性およびタンパク質の組成に関して所望するタイプのものにできる。

析出工程b)の次には最終工程c)を実行する。この最終工程では亜硫酸化され、酸化され析出したホエータンパク質を生成混合物から回収し、可能な場合には後処理を行う。一実施態様によれば、工程b)で析出した亜硫酸化され酸化されたホエータンパク質を、工程c)において好ましくは限外濾過により濃縮し洗浄する。遠心分離または例えばバンド状またはドラム状をしたフィルタにおける濾過により、工程c)の析出濃縮物から水を除くことによって分離を続行できる。この場合、利用可能なタンパク質ペーストが結果として生じる。このタンパク質ペーストは好ましくはNaOHまたはNaOH、Ca(OH)₂およびKOHの混合物である塩基または塩基混合物によりpHを6~8の値まで上げることによって、製品として利用できるものにできる。この場合、Ca(OH)₂の量は元のCaの量と最小限置換するような値であることが好ましい。

工程c)の析出濃縮物を粉末製品に噴霧乾燥するように実行するよう、析出濃縮物を更に処理することも実行できる。この場合、析出濃縮物のpHは塩基または塩基混合物により予

10

20

30

40

50

め6～8の値に調節することが好ましく、塩基または塩基混合物はペーストのpHの前記調節に用いたものと同じであることが好ましい。

本発明の一実施態様によれば、ホエータンパク質の分離は次の順序で行われる。すなわち、限外濾過によるホエーの濃縮、亜硫酸化および酸化による濃縮物中のタンパク質の構造の変性、pHを下げることによる析出、限外濾過による析出したタンパク質の濃縮および洗浄、遠心分離または濾過または噴霧乾燥による分離および析出しないタンパク質の濃縮および洗浄、およびそれらの噴霧乾燥による分離の順で行われる。

ホエーの濃縮は限外濾過により開始され、ホエーからガゼイン粒子を除去し、バクテリアおよびフォスフォリポタンパク質の量を低下する。マイクロ濾過の結果、限外濾過が容易となる。

10

9000～40000D膜を使用することにより、マイクロ濾過から得られた濾液を限外濾過し、約0.6%の原材料からタンパク質成分を4～16倍に濃縮する。この値は2～7%のタンパク質比率に対応する。濃縮物における好ましいタンパク質濃度は原材料の8倍、すなわち約4%である。この場合、濃縮物の乾燥重量は11～12%であり、これはタンパク質に更に主にラクトースが加わったことによる値である。

ホエー濃縮タンパク質の構造の変性は亜硫酸化および酸化により実行される。ここで、ジスルフィド結合のスルホヒドリル基および遊離スルホヒドリル基が定量的に所望のレベルとなるようにスルホン化される。この実施態様では次のようにホエータンパク質の亜硫酸化および酸化が実現される。

反応器内に、例えば4%のタンパク質濃度を有する必要な量のホエー濃縮物を入れる。その反応器は有効な攪拌手段のみならず、温度およびpHの測定および制御手段を有する。濃縮物の温度を、30～50℃、例えば35～45℃に調節する。温度の選択は、例えば所望する反応速度、使用する試薬および分離すべきタンパク質に求める機能的性質およびその他の性質に応じて決める。一定温度のホエー濃縮物に対し0.02～0.2M、例えば0.05～0.1Mの量のスルフィット、例えばNaHSO₃、Na₂S₂O₅またはNa₂SO₃を加え、この混合物を有効に攪拌する。スルフィットの添加量は例えばタンパク質濃度および所望する亜硫酸化の度合いに応じて決める。

20

pHを6.0～7.0、例えば6.5の範囲に調節する。pHの調節のために食品グレードの酸および塩基、例えばHClおよびNaOHを使用する。スルフィットがタンパク質に作用する間の反応時間は10～50分、好ましくは20～40分である。この時間は所望する反応平衡状態を得るよう、上記要因の相乗効果によって決定される。

30

その後、反応器内に酸化剤を添加する。使用できる酸化剤は食品グレードの酸化薬品であり、その活性度はタンパク質を有効に分離でき、タンパク質が所望する性質を有し、所望する組成となるように、当該条件下で制御できる。使用可能な試薬として臭素酸塩、例えばKBrO₃（活性酸素量28.6%）および過酸化剤、例えばCaO₂（活性酸素量22.2%）がある。酸化剤の量は酸化すべきスルホヒドリル基の量および酸化剤内の活性酸素量によって決定され、例えばCaO₂の量は2～7%のタンパク質成分を有するホエー濃縮物中の混合物の容積の0.1～1.0%、好ましくは0.2～0.6%（重量/容量%）である。

ホエー濃縮物のpHを5.0～7.0、例えば5.5～6.5に調節する。このpHの選択はどれだけ速い酸化反応を望むか、かつ目的製品の性質にどのような影響を与えたいかによって決まる。反応温度は亜硫酸化の際の温度と同じでもよいし、また反応速度を制御するように上記値の範囲内で変えてもよい。

40

反応時間は15～60分、好ましくは30～45分でよい。この時間の間、濃縮物を有効に攪拌する。時間の長さを利用して反応完了度、タンパク質の活性度、歩留まり、組成および性質と共に影響を与えることができる。

酸化亜硫酸化の重要な変数のすべて、すなわち種々の工程で利用されるホエー濃縮物のタンパク質含有量、スルフィット量、反応混合物のpH値および使用温度、種々の工程で利用される酸化化合物の性質および量ならびに反応時間を利用して分離プロセスの種々の部分反応の実現および全プロセスの最終結果、すなわち分離されるタンパク質の量、組成および所望する性質に全体として影響を与えることができる。

50

所望する変性の後にpHをゆっくりと3.5～5.0、好ましくは4.0～4.5に低下するまでタンパク質を析出する。析出時のpHは、例えば酸化亜硫酸化の程度、すなわちどれだけの割合の現在のジスルフィドの結合および遊離スルホヒドリル基がスルホン化されたかに応じて決まる。析出のための時間は10～60分、例えば20～40分である。析出したタンパク質の濃縮および洗浄はマイクロ濾過およびバンドまたはドラム状をしたフィルタ内の濾過による分離、または遠心分離によって実行され、この場合、得られる生成物はタンパク質ペーストとなる。

濃縮に関連した洗浄は重要である。その理由は、濃縮物中に存在するラクトースおよび同時に洗浄を行わない場合、タンパク質の調製で残る析出物内に生じる余分な添加薬品および塩を除去することができるからである。

適当な比率でNaOHおよびCa(OH)₂またはNaOH、KOHおよびCa(OH)₂を添加することによりpHを6～8に上げることによりペーストから目的製品を調製する。分離されたホエータンパク質にカルシウムを添加することにより、元のカルシウムバランスが回復され、元のゲル化性質を改善できる。噴霧乾燥によっても析出濃縮物を乾燥できる。この場合、製品は乾燥粉末となる。乾燥前に、上記塩基を使用することにより、洗浄した析出物のpHを6～8まで上げなければならない。このようにすることにより、乾燥生成物に同じ性質が与えられる。析出したタンパク質の濃縮にあたり、マイクロ濾過により生じた濾液を限外濾過により濃縮し、洗浄する。上記塩基を利用することにより、洗浄した濃縮物のpHを6～8までの値に調節し、噴霧乾燥機により粉末となるように乾燥する。

次の実施例は、これまで述べた発明を説明するものである。

実施例1.

エダムチーズの製造で生じた、分離された新鮮なプリホエー、すなわちタンパク質含有量が0.60%（タンパク質の窒素×6.38）および総窒素量に換算したタンパク質含有量（他の窒素化合物も含む）が0.80%のホエーをミリポアペリコンラボラトリー社の装置で0.45μmのフィルター膜を使用してマイクロ濾過した。濾液の一部が4倍に濃縮され、他の部分が8倍に濃縮され、すなわち濃縮物の最終容積がそれぞれの初期容器の25%および12.5%となるように、10000Dの限外濾過膜を用いて同じ装置における限外濾過によってマイクロ濾液を濃縮した。それぞれのタンパク質含有量は2.06重量/容積%および4.01重量/容積%であった。分離するため、2リットルのガラス容器内に1.0リットルの4倍のホエー濃縮物を入れ、これを温度制御可能な水浴中に維持し、その成分を有効な攪拌機を用いて混合した。濃縮物の温度を35℃に調節した。亜硫酸化を開始するため濃縮物に5.2gのNaHSO₃を添加し、NaOHを加えることによりpHを6.5に調節した。

混合物を攪拌し、30分間反応物を放置した。その後、混合物に1.0gのKBrO₃を添加した。pHを6.5に維持した。酸化反応は15分間かかった。その後、混合物にHClを添加することによりpHを4.40に下げることによりタンパク質を析出した。更に30分間析出物を攪拌した。30分間10000rpmでソルバルRC-5Bの遠心分離機内の遠心分離により析出物を分離した。析出したタンパク質は良好に分離された。蒸留水内での懸架および再遠心分離によりタンパク質を洗浄した。タンパク質ペーストは容易に剥離自在であり、複数の小片となるように分離できた。これをカバーつきのガラス容器内に保管し、凍結した。遠心分離により決まるタンパク質収量はホエー濃縮物の3.0g/100mlであった。タンパク質の収量は30分間10000rpmで50mlの遠心分離チューブ内で20mlの析出物+10mlの蒸留水を遠心分離することにより決定した。遠心分離を上澄み液を外に注ぎ、チューブを約15分間、水吸収ベース上に反対向きに維持し、解放された水を抜き、その後、5～10分の間に重量を測定した。パラレル測定の結果は互いに近似していた。こうして得られた結果はタンパク質評価と良好に相関化していたが、結合水の量だけこれらタンパク質評価よりも高かった。測定はかなり高速であり、実行が容易であったので、収量の測定に使用した。

実施例2.

タンパク質含有量が4.01%の先の実施例に述べた1リットルの8倍ホエー濃縮物を45℃に加熱し、有効に攪拌した。これに10.40gのNaHSO₃を添加した。pHを6.5に調節した。亜硫酸化の反応時間は30分であった。その後、この混合物に2.0gのKBrO₃を添加した。pHを6.5

10

20

30

40

50

に維持した。酸化の反応時間は15分であった。反応時間の収量時にHClによりpHを4.45に下げることによりタンパク質を析出した。析出を完了するよう、更に30分間混合物を攪拌した。

実施例1と同じように遠心分離によりタンパク質を分離し、洗浄した。タンパク質は容易に剥離可能であり、複数の小片となるように分離することは容易であった。後に使用するため、カバー付きのガラス容器内で分離してタンパク質ペーストを凍結した。遠心分離により測定されたタンパク質収量はホエー濃縮物の8.0g/100mlであった。

実施例3.

実施例1に記載のように、エダムチーズの製造で生じ、分離され、4倍に濃縮され、1.92%のタンパク質含有量を有する1.0リットルのプリホエーを取り出し、有効に攪拌しながら35℃まで加熱した。濃縮物に5.2kgのNaHSO₃を添加した。pHを6.5に調節し、この値に維持した。反応時間は30分であった。亜硫酸化反応後、混合物に2.2gのCaCO₂ (Ixper 60C、ペロキシドケミー GmbH、ドイツ；活性酸素量約13.3%の量)を添加した。pHを6.5に維持した。酸化時間は15分であり、この間混合物を有効に攪拌した。酸化後、HClによりpHを4.45に下げることによりタンパク質を析出した。更に15分間、攪拌を続けた。タンパク質を分離し、洗浄し、実施例1のように保管した。分離されたタンパク質ペーストは軟質であり、脆弱であり、容易にスプレッドできなかった。遠心分離によって測定されたタンパク質収量はホエー濃縮物の1.75g/100mlであった。

実施例4.

実施例3で調製したホエー濃縮物から1.0リットルの8倍濃縮物を取り出した。この濃縮物のタンパク質含有量も4.01%であった。濃縮物を4.5℃まで加熱し、有効に攪拌し、これに10.40gのNaHSO₃を添加した。pHを6.5に調節し、この値に維持した。反応時間は30分であり、その後、混合物に4.3gのCaCO₂ (Ixper 60C、ペロキシドケミー GmbH、ドイツ)を添加した。pHを6.5に維持し、酸化時間を15分とした。酸化後、HClによりpHを4.45まで下げることによりタンパク質を析出した。更に15分間攪拌を続け、タンパク質を分離し、洗浄し、実施例1のように保管した。タンパク質ペーストはかなり軟質で脆弱であり、スプレッドできなかった。遠心分離法により測定されたタンパク質収量はホエー濃縮物の8.85g/100mlであった。このタンパク質ペーストから2つの約10gのサンプルを取り出し、サンプルの一方に0.4mlの1.0NのNaOHを加え、十分に混合することによりこのサンプルのpHを約6.5までに増し、他方のサンプルに0.25mlの1.0NのNaOHおよび0.15mlの飽和Ca(OH)₂を添加した。pHを上げた後の第1サンプルは軟質でスプレッド可能であり、かたまりとならず、粘着性でなかった。第2サンプルは第1サンプルよりも多少固いが、スプレッド可能であり、かたまりとならず、粘着性でなかった。

実施例5.

エダムチーズの製造の際に生成され、タンパク質含有量が0.59%の分離されたフレッシュなプリホエーを、実施例1と同じ装置および手順により8倍および6倍となるようにマイクロ濾過および限外濾過した。それぞれのタンパク質含有量は3.92%および7.00%であった。タンパク質含有量が3.92%の1リットルの8倍に濃縮されたホエー濃縮物を45℃に加熱し、連続的に攪拌した。

これに9.50gのNa₂S₂O₅を添加し、NaOHによりpHを6.5に調節した。亜硫酸化反応時間は15分であった。その後、この混合物に4.30gのCaO₂を添加し、pHを5.5に調節し、酸化反応時間を30分とした。酸化後、HClによりpHを4.0まで低下し、タンパク質を析出した。析出物を更に15分間攪拌した。ホエーを処理し、約2倍に濃縮した場合と同じミリポアラボラトリ社の装置で0.45μmの膜を使用し、析出物をマイクロ濾過した。濾過は急速であり、濾液は透明であった。このことは、析出したタンパク質が濾過膜を通過しなかったことを示している。濃縮物を同じ容積の蒸留水で2回洗浄し、濃縮物のpHを6.5まで上げた。濃縮物中の乾燥物質含有量および灰分は意図していたように元の量の約30%であった。濃縮物をフリーズ乾燥し、後に使用するため冷凍庫に保管した。析出および分離後にホエータンパク質の比率が維持されているかを判断するため、HPLCを用いて濾液に対する評価を行った。遠心分離法によって測定されたタンパク質収量はホエー濃縮物の9.3g/100mlであった。

実施例6.

先の実施例に記載され、3.93%のタンパク質含有量を有する1.0リットルの8倍に濃縮されたホエー濃縮物を45℃に加熱し、連続的に攪拌した。これに9.5gの $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ を添加し、 NaOH によりpHを6.5に調節した。亜硫酸化を15分間続けた。その後、混合物に酸化剤として2.2gの CaO_2 を添加し、pHを5.5に調節した。反応時間は30分であった。 HCl によりpHを4.0に下げることによりタンパク質を析出した。混合物を更に15分間攪拌し、マイクロ濾過により析出物を2倍に濃縮し、先の実施例と同じように同じ容積の蒸留水で2回洗浄した。析出濃縮物のpHは6.6に上昇した。その乾燥物質含有量は元の値から約31%まで低下した。析出濃縮物をフリーズ乾燥し、冷凍庫に保管した。上記実施例で使用したホエー濃縮物の調製と同じように、ミリポアラボラトリー社の装置で10000D膜を使用した限外濾過によりマイクロ濾過からの濾液を約2倍に濃縮した。濾液濃縮物を同じ容積の蒸留水で2回洗浄し、その後、pHを6.4に上げた。濃縮物の乾燥物質含有量は元の値の約31%まで低下した。濃縮物を保管のためフリーズ乾燥した。処理および析出後のホエータンパク質の比率が保存されているかどうかを判断するため、析出物のマイクロ濾液に対しHPLCによる評価を行った。これら結果と先の実施例の結果とを比較すると、異なる処理の結果としてタンパク質の比率が異なっていることが判った。タンパク質収量に影響を与え、更に析出物および濾液内のタンパク質の比率にも影響を与えるのに、処理を変えることができる。遠心分離法によって設定されたタンパク質収量はホエー濃縮物の8.1g/100mlであった。

10

実施例7.

実施例5に記載された7.0%のタンパク質含有量を有する1.0リットルの16倍に濃縮されたホエー濃縮物を攪拌しながら45℃に加熱した。これに12.6gの Na_2SO_3 を添加し、pHを6.5に調節した。亜硫酸化の反応時間を15分とした。その後、混合物に4.3gの CaO_2 を添加し、pHを6.0に調節した。酸化時間は30分であり、pHを4.0まで低下することによりタンパク質を析出した。更に15分間攪拌を続行し、析出を完了させた。図1のように遠心分離によりタンパク質を分離し、洗浄した。後に使用するため、分離したタンパク質ペーストをカバー付きガラス容器内で凍結した。遠心分離法により測定されたタンパク質収量はホエー濃縮物の12.0g/100mlであった。

20

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開昭59-113848 (JP, A)
特開昭58-060952 (JP, A)
特開昭56-026159 (JP, A)
特開昭47-034449 (JP, A)
特開昭59-059150 (JP, A)
特開平02-261346 (JP, A)
特開昭57-132844 (JP, A)
特開昭57-058858 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

A23J 1/20

A23J 3/08

A23C 21/00