



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **128239** (13) **C2**
(51) МПК (2024.01)
A23J 1/00
A23J 3/14 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

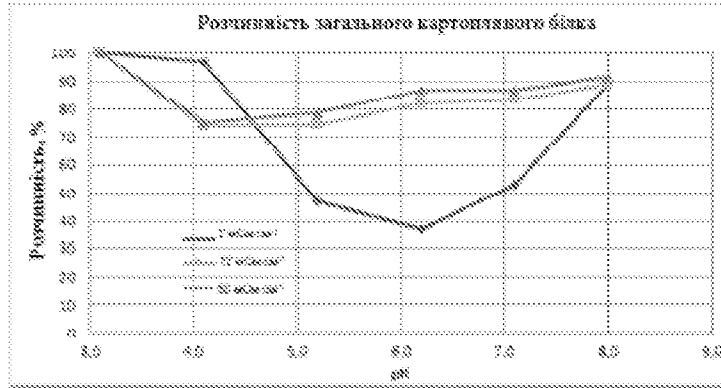
<p>(21) Номер заявки: а 2021 06257</p> <p>(22) Дата подання заявки: 25.05.2020</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 16.05.2024</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 2023197</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 24.05.2019</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: NL</p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: 09.02.2022, Бюл.№ 6</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 15.05.2024, Бюл.№ 20</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/NL2020/050336, 25.05.2020</p>	<p>(72) Винахідник(и): Хабейх Нарваес Давід Ігнасіо (NL), Тьялма Ліббе Фукес (NL), Спелбрінк Робін Ерік Якобус (NL), Лаус Марк Крістіан (NL)</p> <p>(73) Володілець (володільці): КООПЕРАТИ КОНІНКЛЕЙКЕ АВЕБЕ У.А., Prins Hendrikplein 20, 9641 GK Veendam, The Netherlands (NL)</p> <p>(74) Представник: Кістерський Тимофій Арсенійович, реєстр. №457</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2003/003836 A1, 16.01.2003 WO 2017/146568 A1, 31.08.2017 WO 2018/082759 A1, 11.05.2018 ZWIJNENBERG H. J. et. al. Native protein recovery from potato fruit juice by ultrafiltration. Desalination. 2002. Vol. 144. № 1-3. PP. 331- 334, URL: http://dx.doi.org/10.1016/S0011-9164(02)00338-7 WO 2008/069649 A1, 12.0.2008 EP 1920662 A1, 14.05.2008 RALET M-C et. al. Fractionation of potato proteins: solubility, thermal coagulation and emulsifying properties. LWT-food science and technology. Academic press. United Kingdom. 01.08.2000. Vol. 33. No. 5. PP. 380 - 387, URL: http://dx.doi.org/10.1006/fstl.2000.0672 KIM DEOK HAN et. al. Modeling of power generation with thermolytic reverse electrodialysis for low-grade waste heat recovery. Applied Energy. Elsevier. Science publishers. GB. 23.12.2016. Vol. 189. PP. 201 - 210, URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.060 BAIER ANNE K et. al. Influence of high isostatic pressure on structural and functional characteristics of potato protein. Food research international. Elsevier. Amsterdam. NL. 28.05.2015. Vol. 77. PP. 753 - 761, URL: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.053</p>
--	---

(54) ДІАФІЛЬТРАЦІЯ

UA 128239 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до способу виділення нативного білка бульбоплодів шляхом попередньої обробки води після переробки бульбоплодів і діяфільтрації з використанням сольового розчину. Перевага даної послідовності стадій у тому, що білок стабілізується при діяфільтрації, тим самим підвищується ефективність способу, а також якість білка і його вихід.



Фиг. 1

Попит на вегетаріанські та веганські аналоги традиційних продуктів харчування зростає, зокрема, через зростаюче усвідомлення екологічного навантаження, обумовленого виробництвом м'ясних продуктів харчування. Однак білки рослинного походження дотепер не можуть замінити білки тваринного походження з ряду причин. Одна з причин полягає в тому, що найчастіше білки рослинного походження необхідно виділяти та переробляти до моменту приготування продуктів харчування на їхній основі.

Картопляний білок є широко доступним через те, що картоплю переробляють у великих кількостях для одержання крохмалю, а також різних картопляних продуктів. Картопляний білок має амінокислотний склад, що робить його ідеально придатним для вживання в їжу. Однак виділення картопляного білка належної якості є трудомістким процесом.

Картопляний білок зазвичай виділяють з побічних продуктів виробництва крохмалю, які одержують шляхом подрібнювання у порошок або приготування пюре з цільної картоплі з наступним виділенням крохмалю. Отримана рідина містить картопляний білок, який можна виділити різними способами з метою одержання нативного або коагульованого білка. Коагульований білок може бути отриманий звичайними способами, однак його недоліками є відсутність функціональності та розчинності. Тому нативний білок більше переважний для застосування у багатьох харчових продуктах.

Однак виділений нативний картопляний білок найчастіше має неприємний присмак і надмірне офарбування, що утрудняє його вживання в їжу. Дана проблема може бути вирішена шляхом абсорбції або хроматографії, як наприклад, адсорбція у киплячому шарі, мембранна абсорбція або іонообмінна хроматографія. Однак ці способи дорогі та трудомісткі, особливо при застосуванні у промисловому масштабі, оскільки вони вимагають ряд попередніх дій та повинні бути виконані при високій концентрації з метою досягнення прийнятної ефективності.

Також застосовують інші способи виділення нативного білка. У різних умовах застосовують різні мембранні способи, як наприклад, ультрафільтрація та діафільтрація. Однак досить складно виділити білок належної якості шляхом застосування (тільки) таких способів, оскільки білок найчастіше недостатньо чистий. Крім того, недоліком мембранних способів є засмічення мембрани, що не дозволяє застосовувати їх у промислових масштабах. При діафільтрації білок має схильність до агрегування й осадження, що виключає застосування діафільтрації в якості ефективного промислового способу.

Більше універсальні способи виділення білка з побічних продуктів виробництва крохмалю підвищили би доступність картопляного білка та, таким чином, дозволили би підвищити доступність функціонально придатного рослинного білка, тим самим збільшуючи екологічність використання харчових ресурсів. У даному винаході запропонований оптимізований спосіб виділення нативного картопляного білка із застосуванням діафільтрації, який може бути реалізований у промисловому масштабі.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

ФІГ. 1 – розчинність картопляного білка при різних значеннях рН і питомої провідності.

ФІГ. 2 – розчинність картопляного білка при рН=6 і рН=7 і різної питомої провідності 15 під дією механічних напруг.

ФІГ. 3 – графік залежності питомої продуктивності від концентрації білка при первинній та вторинній діафільтрації згідно з прикладом 6.

ФІГ. 4 – розчинність загального ізоляту картоплі при різній питомій провідності.

ФІГ. 5 – розчинність загального ізоляту картоплі при різній питомій провідності. 20

ФІГ. 6 – загальний білковий ізолят, що включає всі білкові фракції, які також присутні у бульбоплоді (мікрофільтрований картопляний сік, MF-PFJ). Стандарти білка L; доріжка 1: Приклад 4, експ. 9 (мікрофільтрований картопляний сік); доріжка 2: Приклад 4, експ. 10 (мікрофільтрований картопляний сік); доріжка 3: Приклад 4, експ. 11 (мікрофільтрований картопляний сік); доріжка 4: Приклад 5 (мікрофільтрований картопляний сік); доріжка 5: Приклад 5, кінцевий продукт (діафільтраційний ретентат); доріжка 6: Приклад 4, експ. 9, кінцевий продукт (сухий); доріжка 7: Приклад 4, експ. 10, кінцевий продукт (сухий); доріжка 8: Приклад 4, експ. 11, кінцевий продукт (сухий).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

У даному винаході запропонований спосіб виділення нативного білка бульбоплодів, який включає:

а) переробку щонайменше одного бульбоплода з одержанням води після переробки бульбоплодів, що містить нативний білок бульбоплодів;

б) попередню обробку зазначеної води після переробки бульбоплодів, яка включає одну або більше з наступних стадій:

ба) концентрування, та/або

- бб) розведення, та/або
- бв) регулювання рН, і/або 5
- бг) флокуляцію, та/або
- бд) термічну обробку, та/або

5 бє) видалення твердих частинок, де в результаті попередньої обробки питома провідність попередньо обробленої води після переробки бульбоплодів, що містить нативний білок бульбоплодів, становить 2–20 $10 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$;

10 в) стадію діяфільтрації попередньо обробленої води після переробки бульбоплодів з використанням сольового розчину, питома провідність якого становить щонайменше 5 $\text{мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, за допомогою 5–300 кДа мембрани; з одержанням, таким чином, зазначеного ізоляту білка бульбоплодів як діяфільтраційний ретентат.

15 Перевага даного способу полягає в тому, що нативний білок бульбоплодів може бути виділений у великій кількості з різних технологічних потоків. Це може бути досягнуто за рахунок високої ефективності, низьких втрат білка, низького екологічного навантаження, низької вартості та відносно невеликої кількості потоків відходів, що дозволяє одержати білок з високою розчинністю, високою чистотою та незмінними функціональними властивостями.

Спосіб згідно з даним винаходом

20 Даний спосіб спрямований на виділення нативного білка бульбоплодів. У даному контексті бульбоплід включає структури, які також можна назвати коренеплодом. Бульбоплід за своєю природою містить білок; переважні типи бульбоплодів також багаті крохмалем, як наприклад бульбоплоди, використовувані для виділення крохмалю.

25 У даному контексті бульбоплід переважно включає картоплю (*Solanum tuberosum*), солодку картоплю (*Ipomoea batatas*), касаву (включаючи *Manihot esculenta*, син. *M. utilissima*, яку також називають маніока, тапіока або юка, а також включаючи *M. palmata*, син. *M. dulcis*, яку також називають маніок солодкий), ямс (*Dioscorea spp*) і/або таро (*Colocasia esculenta*). Більше переважно бульбоплід включає картоплю, солодку картоплю, касаву або ямс, ще більше переважно бульбоплід включає картоплю, солодку картоплю або касаву, ще більше переважно бульбоплід включає картоплю або солодку картоплю, і найбільше переважно бульбоплід включає картоплю (*Solanum tuberosum*).

30 Переважно білок бульбоплодів включає білок картоплі, білок солодкої картоплі, білок касави, білок ямса та/або білок таро. Білок картоплі переважніше. Картопля є бульбоплодом рослини *Solanum tuberosum*, яка має множину різновидів. Виділення білка згідно з даним способом можна проводити з будь-яким сортом картоплі. Сюди входять різновиди, призначені для крохмальної промисловості (крохмальна картопля), а також різновиди, призначені для

35 споживання людиною (споживча картопля).
Всі сорти бульбоплодів містять нативний білок бульбоплодів. Наприклад, нативний білок картоплі можна розділити на три класи: (i) сімейство пататину, високомологічні кислі глікопротеїни з молекулярною масою 43 кДа (з процентним вмістом картопляного білка 40-50 мас. %), (ii) основні інгібітори протеази з молекулярною масою 5-25 кДа (з 10 процентним вмістом картопляного білка 30-40 мас. %) й (iii) інші білки, переважно білки з високою молекулярною масою (з процентним вмістом картопляного білка 10-20 мас. %).

40 Інгібітор протеази, відповідно до визначення у даній заявці, являє собою білок коренеплода або бульбоплода, переважно білок картоплі, який у нативній формі здатний інгібувати протеазну активність протеаз. Загальновідомо, який білок коренеплода або бульбоплода вважається інгібітором протеази. У даному контексті інгібітор протеази відноситься до фракції білка коренеплода або бульбоплода, в якій щонайменше 80 мас. %, переважно щонайменше 85 мас. %, більше переважно щонайменше 90 мас. % усього білка має молекулярну масу щонайбільше 35 кДа, як визначено шляхом ДСН-ПААГ.

45 Пататин, відповідно до визначення у даній заявці, являє собою білок коренеплода або бульбоплода, переважно білок картоплі, який являє собою кислий глікопротеїн, що виконує функцію запасного білка у бульбоплоді. У промисловості щодо переробки коренеплодів і бульбоплодів зазвичай відомо, який з білків коренеплодів або бульбоплодів вважається пататином. У даному контексті пататин відноситься до фракції білків коренеплодів або бульбоплодів, у якій щонайменше 80 мас. %, переважно щонайменше 85 25 мас. %, більше переважно щонайменше 90 мас. % усього білка має молекулярну масу щонайбільше 35 кДа, як визначено шляхом ДСН-ПААГ.

50 ДСН-ПААГ (електрофорез у поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфату натрію (ДСН)) є загальновідомим методом визначення молекулярної маси білка.

60 Даний спосіб спрямований на одержання будь-якого ізоляту нативного білка бульбоплодів. Відповідно до одного варіанта реалізації ізолят нативного білка бульбоплодів являє собою

ізолят нативного інгібітора протеази. Згідно з іншим варіантом реалізації ізолят нативного білка бульбоплодів являє собою ізолят нативного пататину. Згідно з даними варіантами реалізації вода після переробки бульбоплодів може бути піддана стадії видалення одного конкретного білка картоплі перед стадією діафільтрації. Цього можна досягти шляхом абсорбційної хроматографії, селективного осадження або будь-яким іншим відомим способом відділення однієї білкової фракції від іншої. Білкова фракція, яка залишається в розчині при такій переробці, може бути згодом піддана стадії діафільтрації, відповідно до визначення у даній заявці.

Згідно з найбільше переважними варіантами реалізації ізолят білка бульбоплодів являє собою ізолят, що містить нативний інгібітор протеази та нативний пататин. Згідно з іншими найбільше переважними варіантами реалізації ізолят білка бульбоплодів являє собою загальний ізолят нативного білка бульбоплодів.

Застосований у даній заявці термін "загальний ізолят" відноситься до ізоляту білка, що містить інгібітор протеази і пататин, а також будь-який інший білок, що присутній у розглянутому бульбоплоді. Таким чином, загальний ізолят нативного білка бульбоплодів можна визначити як ізолят, що містить весь білок бульбоплодів у нативній формі.

Білковий ізолят, отриманий даним способом, являє собою нативний білковий ізолят. У даному контексті термін "нативний" означає, що виділення білка з бульбоплода досягається без значного впливу на білок. Таким чином, нативний білок суттєво не деградує та суттєво не денатурується. Тобто порядок амінокислот, тривимірна структура та функціональні властивості (як наприклад, розчинність й/або емульгуючі властивості) практично не порушені у порівнянні з білком, який міститься у бульбоплоді.

Ступінь нативності білка можна перевірити в ході експерименту зі збільшення розчинності. Ненативний білок меншою мірою розчинний у воді, на відміну від нативного білка. Розчинність білка можна визначити шляхом диспергування білка у воді, розділяючи отриману рідину на дві фракції та піддаючи одну з фракцій центрифугуванню при 800 g протягом 5 хвилин з одержанням осаду нерозчиненого матеріалу та витягнення надосадової рідини. Розчинність визначають шляхом вимірювання вмісту білка у надосадовій рідині й у необробленому розчині, та виражають вміст білка у надосадовій рідині у відсотках від його вмісту в необробленому розчині. Визначити вміст білка зручно шляхом вимірювання оптичної щільності при 280 нм за допомогою експрес-аналізатора білка Sprint (компанія СЕМ). У даному контексті білок вважається нативним, якщо розчинність білка становить щонайменше 55 %, переважно щонайменше 65 %, більше переважно щонайменше 75 %, ще більше переважно щонайменше 85 % або щонайменше 90 %, більше переважно щонайменше 90 %, ще більше переважно щонайменше 95 %, найбільше переважно щонайменше 98 %.

У даному контексті виділення означає одержання білка або у вигляді (чистого) розчину, або у вигляді білкового порошку. Порошок можна одержати з розчину шляхом висушування розчину. Необов'язково, висушуванню передуює стадія концентрування, як наприклад зворотний осмос, ультрафільтрація або концентрування виморожуванням. У даному контексті виділення означає, що білок бульбоплодів зберігається у солюбілізованій формі до тих пір, поки ізолят білка бульбоплодів не буде висушений з одержанням порошку нативного білка бульбоплода. Таким чином, виділення переважно не включає стадію осадження білка, наприклад, за допомогою альгінату, що призводить до виділення фракції осадженого білка, і наступну стадію ресолюбілізації осадженого білка, як наприклад розчинення фракції осадженого білка після виділення у водному розчиннику, проведене з одержанням нативного білка бульбоплодів. Осадження білка та наступна ресолюбілізація можуть призвести до незначної денатурації, і тому осаджений та ресолюбілізований білок не є ізолятом білка згідно з даним винаходом.

Згідно з даним винаходом, ізолят нативного білка бульбоплодів можна одержати шляхом діафільтрації (ДФ) з використанням сольового розчину, що має питому провідність щонайменше $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Діафільтрація являє собою процес видалення низькомолекулярних сполук шляхом розведення ретентату при видаленні фільтрату за допомогою діафільтраційних мембран, що характеризуються номінально затримуваною молекулярною масою. Значення номінально затримуваної молекулярної маси 10 кДа означає, що мембрана може втримувати з вихідного розчину 90 % молекул з молекулярною масою 10 кДа. Ізолят нативного білка бульбоплодів одержують у вигляді діафільтраційного ретентату. Солі, присутні у попередньо обробленій воді після переробки бульбоплодів, можуть бути вилучені шляхом діафільтрації, але можуть бути замінені сіллю у сольовому розчині.

У даному контексті діафільтраційна мембрана (ДФ мембрана) являє собою мембрану, використовувану при діафільтрації. Переважна номінально затримувана молекулярна маса ДФ мембрани становить від 3 до 500 кДа, переважно від 5 до 300 кДа, більше переважно від 5 до

200 кДа, як наприклад, переважно від 30 до 200 кДа, більше переважно від 40 до 120 кДа, ще більше переважно від 50 до 100 кДа. Відповідно до одного варіанта реалізації номінально затримувана молекулярна маса може становити 3-30 50 кДа, переважно 5-25 кДа, як наприклад 5-15 кДа або 15-25 кДа. Згідно з іншим варіантом реалізації номінально затримувана

5 молекулярна маса може становити 50-200 кДа, переважно 50-150 кДа.
 Переважними ДФ мембранами є мембрани з полісульфону (ПС), поліефірсульфону (ПЕС), полівініліденфториду (ПВДФ), поліакрилонітрилу (ПАН), регенованої целюлози і поліпропілену (ПП), переважно мембрани з ПЕС або ПС. Переважними ДФ мембранами є анізотропні ДФ мембрани. ДФ мембрана може бути виконана у вигляді трубки, спірального намотування, порожнього волокна, пластини і рамки або у вигляді блоків поперечно-обертальної зміни зрушення. Найбільше переважними ДФ мембранами є трубчасті ДФ мембрани. Кожна з цих мембран може мати номінально затримувану молекулярну масу відповідно до визначення у даній заявці.

15 Згідно з переважними варіантами реалізації діафільтрацію виконують як безперервний (з поперечним потоком) процес. Наприклад, робочий потік може становити від 3 до 300 л·(год·м²)⁻¹, переважно від 5 до 200 л·(год·м²)⁻¹, більше переважно від 5 до 100 л·(год·м²)⁻¹, більше переважно від 6 до 70 л·(год·м²)⁻¹, більше переважно від 6 до 30 10 л·(год·м²)⁻¹, більше переважно від 7 до 30 л·(год·м²)⁻¹, більше переважно від 9 до 20 л·(год·м²)⁻¹.

20 Було виявлено, що основні білкові фракції білка бульбоплодів, зокрема білка картоплі, мають протилежний заряд при багатьох значеннях рН. Рівень рІ пататину становить 4,8-5,2, тоді як рівень рІ інгібітора протеази становить 5,8-9. Навіть значення 15 рН, оптимізовані для розчинності, не можуть запобігти агрегації, осадженню та засміченню, зокрема, при діафільтрації. Було виявлено, що питома провідність розчину значно впливає на розчинність білка, і що низька розчинність може бути компенсована збільшенням питомої провідності. Це особливо важливо при діафільтрації.

25 Було виявлено, що для будь-якого розчину, що містить нативний ізолят білка, відповідно до визначення у даній заявці, важливо, щоб питома провідність залишалася відносно високою протягом усього процесу виділення. Питома провідність сольового розчину, з використанням якого проводять діафільтрацію, повинна становити щонайменше 5 мСм·см⁻¹, а питома провідність вихідного розчину повинна становити 2–20 мСм·см⁻¹.

30 При діафільтрації білок знаходиться під сильним впливом механічних напруг поблизу мембрани. Профіль потоку при діафільтрації збирає різні білкові молекули разом, що призводить до примусової агрегації й осадження. Більше того, білки можуть взаємодіяти з мембраною. Таким чином, механічні напруги, під впливом яких перебуває білок при діафільтрації, та будь-які взаємодії з мембранами призводять до засмічення мембрани, що утрудняє діафільтрацію білкових розчинів у промислових масштабах.

35 Було виявлено, що сольовий розчин, який має питому провідність щонайменше 5 мСм·см⁻¹, стабілізує білок, що перебуває під дією механічних напруг, які виникають при діафільтрації, тим самим підтримуючи і навіть збільшуючи розчинність білка при механічних напругах. Це збільшує стабільність потоку, збільшує тривалість діафільтрації, а також зводить до мінімуму втрати білка. Отже, необхідно проводити діафільтрацію з використанням сольового розчину. Це важливо для підтримання стабільності білка в розчині при діафільтрації. Застосований у даній заявці термін "сольовий розчин" визначається як розчин, що містить солі, питома провідність якого становить щонайменше 5 мСм·см⁻¹.

45 Було виявлено, що питома провідність сольового розчину повинна становити щонайменше мСм·см⁻¹, переважно щонайменше 8 мСм·см⁻¹, більше переважно щонайменше 15 мСм·см⁻¹ з метою збереження високої розчинності всього білка бульбоплодів при діафільтрації. Однак, щоб уникнути надмірного додавання солі при діафільтрації, питома провідність переважно повинна становити менше 100 мСм·см⁻¹, більше переважно менше 50 мСм·см⁻¹, більше переважно менше 20 мСм·см⁻¹, ще більше переважно менше 18 мСм·см⁻¹.

50 Крім того, важливо, щоб питома провідність діафільтрованого розчину (вихідний розчин або вихідна рідина) становила 2–20 мСм·см⁻¹, переважно 5–18 мСм·см⁻¹, більше переважно 8–14 мСм·см⁻¹. Це є гарантією того, що білок не випаде в осад до проведення діафільтрації. Рівень рН діафільтрованого вихідного розчину переважно нижче 4,0 або вище 5,5, більше переважно 5,5-12, ще більше переважно 5,5-7,0.

55 Відповідно до інших переважних варіантів реалізації діафільтрацію проводять з використанням сольового розчину, що має питому провідність відповідно до визначення у даній заявці, переважно 5–20 мСм·см⁻¹, переважно 5–18 мСм·см⁻¹, більше переважно 8–15 20 мСм·см⁻¹, ще більше переважно 9–14 мСм·см⁻¹, як наприклад 9–11 або 10–13 мСм·см⁻¹.

60 Сольовий розчин переважно містить хлоридну сіль, як наприклад NaCl, KCl і/або CaCl₂,

переважно NaCl або KCl. Сольовий розчин переважно може містити KCl. В альтернативному варіанті, сольовий розчин переважно може містити NaCl. Крім того, в альтернативному варіанті, сольовий розчин включає суміш NaCl і KCl.

5 Переважно сіль являє собою NaCl. У випадку з NaCl концентрація солі у сольовому розчині може становити 0,1-5 мас. %, переважно 0,2-2 мас. %.

Фахівець в даній області може визначити масові концентрації (або молярності) при відомих значеннях питомої провідності у присутності або відсутності інших розчинених речовин на основі загальних знань. Наприклад, питома провідність розчину NaCl з 0,33 30 мас. % становить 5,3 мСм·см⁻¹.

10 Згідно з найбільше переважними варіантами реалізації сольовий розчин не містить солей важких металів, як наприклад солі кадмію, ртуті, свинцю або миш'яку. Відповідно до інших переважних варіантів реалізації сольовий розчин додатково містить NH₄HCO₃, який збільшує робочий потік.

15 Відповідно до інших переважних варіантів реалізації рівень рН сольового розчину може становити менше 4,0 або більше 5,5, більше переважно 5,5-12, більше переважно 5,5-8,0, ще більше переважно 6,0-8,0, як наприклад 5,5-7,0 або 6,0-7,0. Згідно з переважними варіантами реалізації заданий рівень рН підтримується протягом усього процесу діалізації. Відповідно до інших переважних варіантів реалізації сольовий розчин, застосований для додаткових стадій діалізації, має більше високий рівень рН, як наприклад 8,0-12,0, переважно 9,0-11,0, що додатково збільшує робочий потік через мембрану.

20 Діалізацію переважно проводять при ступені розведення від 5:1 до 1:10, переважно від 1:1 до 1:10 (вихідна рідина – сольовий розчин), переважно від 1:1 до 1:5, більше переважно від 1:1 до 1:4. Діалізаційний ретентат може бути підданий другій, третій або наступній стадії діалізації.

25 Дані умови призводять до одержання діалізаційного ретентату, що містить чистий нативний білок бульбоплодів. Діалізаційний ретентат містить у відсотках від сухої речовини щонайменше 75 мас. %, переважно щонайменше 80 мас. %, більше 15 переважно щонайменше 85 мас. %, ще більше переважно щонайменше 90 мас. % нативного білка бульбоплодів, переважно щонайбільше 1,0 мас. %, більше переважно щонайбільше 0,5 мас. %, більше 30 переважно щонайбільше 0,1 мас. % від загальної кількості глюкози, фруктози і сахарози, переважно щонайбільше 1,0 мас. % вільних амінокислот бульбоплодів, більше переважно щонайбільше 0,5 мас. %, більше переважно щонайбільше 20 0,1 мас. % небілкових амінокислот бульбоплодів, переважно щонайбільше 10 мг/кг, більше переважно щонайбільше 5 мг/кг сульфату, переважно щонайбільше 200 мг/кг, більше переважно щонайбільше 100 мг/кг, більше 35 переважно щонайбільше 50 мг/кг, ще більше переважно щонайбільше 25 мг/кг глікоалкалоїдів, переважно щонайбільше 5 мг/кг важких металів, які вибрані з групи, що складається з кадмію, ртуті, свинцю та миш'яку, і/або переважно щонайбільше 10 мас. % хлоридних солей, більше переважно щонайбільше 5 мас. %. Вміст золи становить переважно щонайменше 5 мас. %, більше переважно щонайменше 3 мас. %, більше переважно щонайменше 1 мас. %. Більше 40 того, бажано, щоб вміст калію був нижче 4 мас. %, переважно нижче 2 мас. %, більше переважно нижче 1 мас. %. Згідно з найбільше переважними варіантами реалізації діалізаційний ретентат відповідає всім зазначеним комбінаціям діапазонів параметрів. Усі кількості виражені у відсотках від сухої речовини.

45 Згідно з переважними варіантами реалізації діалізацію проводять з використанням сольового розчину на всіх стадіях. Відповідно до іншого переважного варіанта реалізації зокрема, у випадках, коли сольовий розчин застосовують з відносно високою питомою провідністю в межах зазначених діапазонів, за діалізацією з використанням сольового розчину може слідувати стадія діалізації з використанням води при більше низькій питомій провідності або з використанням звичайної води, з метою видалення солей та виділення 50 нативного білка бульбоплодів, що по суті не містить солі.

Переважно, питому провідність діалізованого розчину (вихідний розчин або вихідна рідина) підтримують в межах зазначених діапазонів. Згідно з даним варіантом реалізації рівень рН переважно залишається незмінним на всіх стадіях діалізації. Таким чином, засмічення мембран може бути збалансоване з необхідністю видалення солі після діалізації. Таким 55 чином, можна одержати ізолят білка бульбоплодів з низьким вмістом солі стосовно сухої речовини.

В альтернативному варіанті діалізаційний ретентат необов'язково може бути підданий стадії ультрафільтрації (УФ). Це призводить до концентрування діалізаційного ретентату з одночасним видаленням щонайменше частини солі, яка була додана на стадії діалізації. 60 Переважно, щоб питома провідність залишалася більш-менш постійною при ультрафільтрації.

Таким чином, одержують концентрований ізолят білка бульбоплодів з низьким вмістом солі стосовно сухої речовини. Переважно концентрований ізолят білка бульбоплодів, отриманий в результаті ультрафільтрації, відповідає всім параметрам, описаним вище для діафільтраційного ретентату, але, крім того, вміст солі в ньому, виражений у вигляді зольного залишку, становить менше 5 20 мас. %, переважно менше 3 мас. %, ще більше переважно менше 1 мас. %. Крім того, переважно, щоб вміст калію становив менше 4 мас. %, переважно менше 2 мас. %, більше переважно менше 1 мас. %.

Ультрафільтрація може бути виконана за допомогою того ж або іншого встаткування, використовуюваного при діафільтрації. Таким чином, номінально 25 затримувана молекулярна маса мембрани може становити від 3 до 500 кДа, переважно від 5 до 300 кДа, більше переважно від 5 до 200 кДа, переважно від 30 до 200 кДа, більше переважно від 40 до 120 кДа, ще більше переважно від 50 до 100 кДа. Відповідно до одного варіанта реалізації номінально затримувана молекулярна маса може становити 3-50 кДа, переважно 5-25 кДа, як наприклад 5-15 кДа або 15-25 кДа, або 50-200 кДа, переважно 50-150 кДа, незалежно від мембрани, використовуваної при діафільтрації.

Переважними УФ мембранами є мембрани з полісульфону (ПС), поліефірссульфону (ПЕС), полівініліденфториду (ПВДФ), поліакрилонітрилу (ПАН), регенованої целюлози і поліпропілену (ПП), переважно мембрани з ПЕС або ПС, також незалежно від мембрани, використовуваної при діафільтрації. Переважними УФ мембранами є анізотропні УФ мембрани. УФ мембрана може бути виконана у вигляді трубки, спірального намотування, порожнього волокна, пластини і рамки або у вигляді блоків поперечно-обертальної зміни зрушення. Найбільше переважними УФ мембранами є трубчасті УФ мембрани.

Робочі потоки також можуть бути такими ж або відмінними від робочих потоків при діафільтрації, але зазвичай є подібними до робочих потоків при діафільтрації, як 5 описано вище. УФ переважно проводять так, щоб одержати концентрований ізолят білка бульбоплодів, що містить загальну кількість розчинених твердих речовин в межах 0,5–25° за Бріксом, переважно 5–22° за Бріксом, більше переважно 10–18° за Бріксом, ще більше переважно 12–17° за Бріксом, ще більше переважно 14–16° за Бріксом. Відповідно до інших переважних варіантів реалізації загальна кількість розчинених твердих частинок може становити до 30° за Бріксом, до 40° за Бріксом або до 50° за Бріксом.

Згідно з переважними варіантами реалізації ультрафільтрацію виконують за допомогою того ж устаткування, що і при проведенні діафільтрації. Таким чином, мембрани, робочі потоки й інші параметри способу, а також устаткування переважно однакові. Це збільшує робочу ефективність способу.

Потім ізолят нативного білка бульбоплодів може бути висушений з одержанням порошку нативного білка бульбоплодів. Висушування можна проводити будь-якими способами, відомими в даній області техніки, переважно шляхом висушування розпиленням або висушування виморожуванням. Необов'язково, ізолят нативного білка бульбоплодів піддають додатковій стадії концентрування перед висушуванням, переважно шляхом зворотного осмосу, випарювання або концентрування виморожуванням. Способи, як цього добитися, описані в інших джерелах й є загальновідомими.

Найбільше переважно, щоб перед висушуванням рівень рН ізоляту білка бульбоплодів доводили до 5,5-7,0, переважно до 6,0-7,0. Це збільшує стабільність порошку нативного білка бульбоплодів, що полегшує його зберігання.

Крім того, переважно, щоб рівень рН ізоляту білка бульбоплодів, зокрема концентрованого водного ізоляту білка бульбоплодів, був доведений до значення вище 2,5, переважно вище 2,75 з метою стабілізації в'язкості білкового розчину та запобігання загустіння розчину за час його зберігання перед висушуванням. Переважно дані значення рН застосовні для ізоляту білка бульбоплодів, що містить інгібітор протеази бульбоплодів.

Крім того, рівень рН концентрованого ізоляту білка бульбоплодів може бути доведений до значення нижче 4,0, переважно нижче 3,5, більше переважно нижче 3,0, також з метою стабілізації в'язкості білкового розчину за час зберігання перед висушуванням. Переважно дані значення рН застосовні для ізоляту білка бульбоплодів, що містить пататин бульбоплодів.

З метою ефективною реалізації даного способу діафільтрації важливо використовувати відносно чистий вихідний розчин для діафільтрації, який містить нативний білок бульбоплодів, відповідно до визначення у даній заявці. У даному контексті чистий вихідний розчин для діафільтрації одержують згідно зі стадіями а) і б).

На стадії а) даного способу щонайменше один бульбоплід переробляють з одержанням водної рідини, що містить білок бульбоплодів. Дану рідину можна назвати водою після переробки бульбоплодів. Така переробка включає, наприклад, перетирання, приготування

пюре, подрібнювання на тертці, дроблення, пресування або нарізування бульбоплодів і, необов'язково, з додаванням води, з одержанням зазначеної води після переробки бульбоплодів, що містить нативний білок бульбоплодів.

5 Водна рідина може містити крохмаль, і переважно її піддають стадії видалення крохмалю, наприклад, шляхом декантування, циклонування або фільтрації, як відомо в даній області техніки, для одержання води після переробки бульбоплодів, що містить нативний білок бульбоплодів. Згідно з даним варіантом реалізації вода після переробки бульбоплодів переважно є побічним продуктом виробництва крохмалю, наприклад картопляним соком, отриманим після виділення крохмалю у картопляній промисловості.

10 Згідно з іншими варіантами реалізації бульбоплоди можна переробляти шляхом нарізування з метою надання форми, яка є основою для продуктів із перероблених бульбоплодів, таких, як наприклад, чіпси та картопля фрі, переважно з картоплі. Нарізування бульбоплодів у присутності води призводить до одержання води після 20 переробки бульбоплодів, що містить нативний білок бульбоплодів.

15 Відповідно до одного варіанта реалізації бульбоплід може бути перероблений струминним потоком води для нарізування бульбоплода. Згідно з іншим варіантом реалізації бульбоплід може бути перероблений шляхом нарізування за допомогою ножів, наприклад, у присутності води. Рідина, одержувана в результаті таких процесів 25 нарізування, містить нативний білок бульбоплодів й є додатковим переважним типом води після переробки бульбоплодів на стадії а).

20 На стадії б) воду після переробки бульбоплодів піддають щонайменше одній стадії попередньої обробки, як наприклад концентрування, розведення, регулювання рівня рН, флокуляція, видалення твердих частинок і/або термічна обробка, в результаті чого 30 одержують попередньо оброблену воду після переробки бульбоплодів, що містить нативний білок. Ці стадії можна виконувати у будь-якому порядку. Видалення твердих частинок відноситься до способів видалення дрібних нерозчинних частинок з розчину. Такі нерозчинні частинки включають (агрегати) ліпідів, нерозчинних білків, залишкових фрагментів клітинних стінок, невеликих зерен крохмалю або їх фрагментів, мікроорганізмів і частинок ґрунту. Попередня обробка важлива для того, щоб вода після переробки бульбоплодів могла бути ефективно оброблена з мінімальним розкладанням або денатурацією білка або взагалі без них, а також для запобігання засмічення фільтрів і мембран, утворення плівки і накипу на поверхнях технологічного встаткування та для забезпечення високої стабільності й ефективності способу.

30 Концентрування води після переробки бульбоплодів може бути проведене будь-яким способом, відомим в даній області техніки, з метою видалення надлишку води. Переважними способами є способи, придатні для роботи при відносно низькій температурі, як наприклад 40 °С або нижче, переважно 35 °С або нижче, більше переважно 30 °С або нижче, ще більше переважно 25 °С або нижче. Більше того, переважно, що 10 попередня обробка шляхом концентрування може відбуватися при високій швидкості процесу. Переважними способами концентрування води після переробки бульбоплодів є ультрафільтрація, зворотний осмос і 40 концентрування виморожуванням, переважно ультрафільтрація. Дані способи відомі в даній області техніки.

Відповідно до одного варіанта реалізації концентрування проводять шляхом 15 концентрування виморожуванням. Концентрування виморожуванням можна проводити способом, описаним у WO 2017/146568, або іншими способами, відомими в даній області техніки.

45 Згідно з іншим варіантом реалізації концентрування проводять шляхом зворотного осмосу. Зворотний осмос може бути виконаний за допомогою мембран зворотного 20 осмосу, які не мають видимих пор, як відомо в даній області техніки. Мембрани зворотного осмосу розділяють розчинені речовини на основі різної розчинності розчинених речовин у матеріалі мембрани, як відомо в даній області техніки. Робочі потоки при проведенні зворотного осмосу, як правило, аналогічні робочим потокам при проведенні діалізації (або ультрафільтрації), як наприклад, 50 2–50 л·(год·м²)⁻¹, 25 переважно 5–30 л·(год·м²)⁻¹, більше переважно 10–25 л·(год·м²)⁻¹.

Згідно з іншим, найбільше переважним варіантом реалізації концентрування проводять шляхом ультрафільтрації. Перевага ультрафільтрації в тому, що вона може бути здійснена при високому робочому потоці, у той же час будучи економічною. Робочий потік може становити, наприклад, від 3 до 150 л·(год·м²)⁻¹, переважно від 5 до 50 30 л·(год·м²)⁻¹, переважно від 7 до 30 л·(год·м²)⁻¹, ще більше переважно від 9 до 20 л·(год·м²)⁻¹. Згідно з переважними варіантами реалізації ультрафільтрацію виконують як безперервний (з поперечним потоком) процес.

60 Переважними мембранами для використання при попередній обробці шляхом

ультрафільтрації є мембрани з полісульфону (ПС), поліефірссульфону (ПЕС), полівініліденфториду (ПВДФ), поліакрилонітрилу (ПАН), регенованої целюлози і поліпропілену (ПП), переважно мембрани з ПЕС і ПС. Переважно, номінально затримувана молекулярна маса мембран становить 3-500 кДа, переважно, 5-300 кДа.

5 При ультрафільтрації води після переробки бульбоплодів, що містить відносно невелику кількість зважених твердих частинок (наприклад, сік, що містить невелику 5 кількість клітинного сміття та/або вже пройшов стадію видалення твердих частинок), номінально затримувана молекулярна маса мембран становить переважно 3-100 кДа, як наприклад 5-50 кДа, більше переважно 5-20 кДа.

10 При ультрафільтрації води після переробки бульбоплодів, що містить відносно велику кількість зважених твердих частинок (наприклад, сік, що містить велику кількість 10 клітинного сміття та ще не пройшов стадію видалення твердих частинок), номінально затримувана молекулярна маса мембран становить переважно 20-300 кДа, більше переважно 50-150 кДа.

15 Додаткові умови процесу попередньої обробки шляхом ультрафільтрації можуть бути такими ж, як визначено вище для випадку діафільтрації. Згідно з переважними варіантами реалізації попередню обробку шляхом ультрафільтрації проводять за допомогою того ж устаткування, що і при проведенні діафільтрації. Тобто, будь-яку стадію ультрафільтрації переважно проводити за допомогою мембрани, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 5-300 кДа, переважно 30-200 кДа, більше переважно 40-120 кДа, ще більше переважно 50-100 кДа. "Будь-яка стадія 20 ультрафільтрації" означає, що, якщо стадія ультрафільтрації присутня, то ультрафільтрація переважно повинна бути виконана за допомогою зазначених типів мембран. Альтернативне формулювання може полягати в тому, що ультрафільтрація, якщо така є, повинна бути виконана за допомогою зазначених типів мембран.

25 Розведення води після переробки бульбоплодів може бути виконане будь-яким 25 способом, відомим в даній області техніки. Таким чином, вода після переробки бульбоплодів може бути розведена (водопровідною або демінералізованою) водою, буфером або розчином кислоти або основи. Згідно з деякими варіантами реалізації розведення може бути виконане шляхом діафільтрації в якості стадії попередньої обробки згідно з методологією, а також за допомогою встаткування, як згадано вище. Попередня обробка може включати один або декілька етапів регулювання рівня рН. Регулювання рівня рН може бути виконане шляхом додавання підходящої кислоти або основи, як відомо в даній області техніки. Підходяща кислота може являти собою, наприклад, соляну кислоту, лимонну кислоту, оцтову кислоту, мурашину кислоту, фосфорну кислоту, сірчану кислоту та молочну кислоту; підходяща основа може являти собою, наприклад, гідроксид натрію або калію, хлорид амонію, карбонат натрію або калію, оксиди і гідроксиди кальцію та магнію.

30 Регулювання рівня рН може бути виконане з різними цілями. Регулювання рівня рН може бути виконане з метою зміни питомої провідності розчину, а також зміни розчинності білка. У даному контексті регулювання рівня рН не повинно призводити до повної денатурації білка, як наприклад, при кислотній коагуляції білка. Однак регулювання рівня рН води після переробки бульбоплодів може призвести до часткового осадження білка або осадження інших компонентів води після переробки бульбоплодів, які згодом можуть бути вилучені на стадії видалення твердих частинок.

45 Наприклад, доведення рівня рН до 4,0-5,5 може бути виконане з метою осадження щонайменше частини фракції пататину, зокрема, при високій концентрації, як наприклад, при концентрації білка 5-20 мас. % у воді після переробки бульбоплодів, з одержанням води після переробки бульбоплодів, що містить більше високу відносну кількість нативного інгібітора протеази. Осаджений білок може бути згодом вилучений на стадії видалення твердих частинок, згідно з визначенням в інших джерелах. Це збільшує відносну кількість нативного інгібітора протеази в ізоляті нативного білка бульбоплодів.

50 Флокуляція може бути виконана шляхом додавання підходящого флокулянта, як наприклад, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, катіонний або аніонний поліакриламід, хітозан або карагінан, як відомо в даній області техніки. Також можна використовувати способи, описані, наприклад, у WO2016/036243. Після флокуляції переважно виконують стадію видалення твердих частинок, як наприклад декантування, фільтрація, центрифугування, циклонування або мікрофільтрація.

55 Термічна обробка також може бути виконана в якості попередньої обробки за умови, що термічна обробка не призводить до повної коагуляції білка. Наприклад, шляхом термічної обробки при 40–55 °C протягом 1–120 хвилин можна вилучити значну частину пататину, який згодом може бути вилучений на стадії видалення твердих частинок. Також відомо, що інгібітор протеази бульбоплодів має більше високу термостійкість, ніж пататин, і що нагрівання може

60

призвести до часткової або повної денатурації пататину. Таким чином, етап термічної обробки може бути виконаний в комбінації з етапом видалення твердих частинок, наприклад, з одержанням води після переробки 30 бульбоплодів, збагаченої нативним інгібітором протеази. Наприклад, термічна обробка при 60–80 °С, переважно при 70–73 °С, може бути виконана з метою осадження щонайменше частини фракції пататину; потім може слідувати стадія видалення твердих частинок з метою виділення нативного білка бульбоплодів, збагаченого нативним інгібітором протеази.

У даному контексті видалення твердих частинок може бути виконане на додаток до іншої стадії попередньої обробки, як описано вище, і переважно після неї, але також може бути виконане як єдина стадія попередньої обробки. Видалення твердих частинок, відповідно до визначення у даній заявці, також може бути виконане при будь-якій стадії даного способу. Однак переважно видалення твердих частинок виконують під час попередньої обробки. Попередня обробка переважно включає стадію видалення твердих частинок.

У даному контексті видалення твердих частинок переважно являє собою стадію фільтрації, центрифугування, циклонування, декантації, нанофільтрації або мікрофільтрації, найбільше переважно мікрофільтрації. Ці етапи можна виконувати, як відомо в даній області техніки.

Мікрофільтрація (МФ) є найбільше переважним способом попередньої обробки у будь-якому з представлених варіантів реалізації але, зокрема, у варіантах реалізації де видалення твердих частинок є єдиною стадією попередньої обробки. Мікрофільтрація може бути виконана з метою відділення дрібних частинок від рідини. Мікрофільтрацію можна проводити за допомогою різних мембран, виготовлених з полісульфону (ПС), полівініліденфториду (ПВДФ), поліакрилонітрилу (ПАН) та поліпропілену (ПП), а також за допомогою керамічних мембран, виготовлених із оксидів цирконію, титану або алюмінію. Мікрофільтрацію переважно виконують за допомогою мембран, що мають розмір пор 0,1-10 мкм, переважно 0,2-4 мкм, більше переважно 0,3-1,5 мкм.

Мікрофільтрація може бути виконана як при постійному тиску, так і при постійному робочому потоці. Тиск може варіюватися від 1,5·10⁵ до 5·10⁵ Па. Робочий потік може варіюватися від 0 до 350 л·(год·м²)⁻¹, переважно від 45 до 350 л·(год·м²)⁻¹. Мікрофільтрація води після переробки бульбоплодів призводить до того, що оптична щільність води після переробки бульбоплодів при 620 нм, переважно стає нижче 0,2, більше переважно нижче 0,1 у порівнянні з контрольним зразком демінералізованої води.

Згідно з найбільше переважними варіантами реалізації попередня обробка включає стадію мікрофільтрації. Згідно з іншими найбільше переважними варіантами реалізації попередня обробка включає стадію ультрафільтрації. Згідно з найбільше переважним варіантом реалізації попередня обробка включає тільки мікрофільтрацію або складається з неї. Згідно з ще одним найбільше переважним варіантом реалізації попередня обробка включає або складається з ультрафільтрації та наступної мікрофільтрації або мікрофільтрації та наступної ультрафільтрації.

В результаті попередньої обробки одержують відносно чисту воду після переробки бульбоплодів, яка є вихідним розчином при виконанні діафільтрації. Попередня обробка переважно призводить до одержання вихідного розчину для діафільтрації, який має оптичну щільність при 620 нм нижче 0,2, більше переважно нижче 0,1 у порівнянні з контрольним зразком демінералізованої води. Крім того, попередня обробка переважно призводить до одержання вихідного розчину для діафільтрації, який має питому провідність та рН, згідно з визначенням у даній заявці. Загальна кількість розчинених 5 твердих частинок у вихідному розчині для діафільтрації переважно становить 2–10° за Бріксом, більше переважно 3–8° за Бріксом, наприклад 4–6° за Бріксом. Загальна кількість зважених твердих частинок становить менше 0,05 об. %, переважно менше 0,25 об. %, більше переважно менше 0,01 об. %. Найбільше переважно, щоб зважені тверді частинки практично були відсутні. Відносно цього загальна кількість зважених твердих частинок вимірюється центрифугуванням зразка та визначенням об'ємної частки осаду щодо надосадової рідини після центрифугування.

Згідно з іншими найбільше переважними варіантами реалізації спосіб включає стадію видалення глікоалкалоїдів з одержанням ізоляту білка бульбоплодів, що містить не більш 200 мг/кг глікоалкалоїдів. У даному контексті глікоалкалоїди являють собою глікозильовані алкалоїди, визначені як сукупність похідних соланіну та чаконіну. Дана кількість також може бути названа загальним вмістом глікоалкалоїдів і може бути визначена відповідно до методу Laus et al., (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"). Як відомо, лікоалкалоїди отрутні для людини, тому їх присутність в ізоляті білка бульб повинна бути обмежена.

Способи видалення глікоалкалоїдів в основному відомі та можуть бути представлені адсорбцією активованим вугіллям, гідрофобними смолами або різними типами глини, хроматографією, кислотною екстракцією, ферментативним перетворенням або ферментацією. Зразкові способи описані у WO 2008/056977 і WO 2008/069651. Переважно, видалення

5 глікоалкалоїдів виконують шляхом адсорбції, наприклад, пропущенням технологічного потоку, що містить глікоалкалоїди, через колонку, що містить підходящий адсорбент, як наприклад активоване вугілля, гідрофобні смоли або різні типи глини. Даний етап може бути виконаний у

10 будь-який момент даного способу, але переважно його виконують як частину стадії попередньої обробки б) або після стадії в).

В інших переважних варіантах реалізації даного винаходу спосіб включає початковий етап, коли щонайменше один бульбоплід очищають від шкірки перед обробкою. Відповідно спосіб передбачає обробку очищених бульбоплодів. Перевага полягає в тому, що одержувана вода після переробки бульбоплодів значно більше чиста та, отже, потребує меншої попередньої

15 обробки перед стадією діяфільтрації даного способу. Крім того, очищення бульбоплодів призводить до зміни білкового складу, так що отриманий нативний білок бульбоплодів збагачений амінокислотами аспарагіною кислотою й аспарагіном, глутаміновою кислотою та глутаміном, тирозином, проліном й аргініном.

У найбільше переважних варіантах реалізації даного винаходу первинна діяфільтрація або ультрафільтрація забезпечує пермеат, що містить вільні амінокислоти бульбоплода. Таким

20 чином, пермеат, отриманий після проведення первинної діяфільтрації або ультрафільтрації не утилізують в якості відходів, а окремо переробляють з метою одержання вільних амінокислот бульбоплода. Така переробка переважно включає стадію висушування, переважно шляхом висушування розпиленням і/або висушування виморожуванням, з одержанням порошку вільних амінокислот бульбоплода. Висушуванню може передувати стадія концентрування, як наприклад

25 ультрафільтрація, зворотний осмос і/або концентрування виморожуванням, як описано в інших джерелах.

Даний спосіб переважно застосовують у промисловому масштабі. Таким чином, даний спосіб переважно застосовують з метою одержання щонайменше 5 кг білка за годину, більше

30 переважно щонайменше 25 кг білка за годину, ще більше переважно щонайменше 50 кг білка за годину, потенційно до декількох тонн за годину. У переважних варіантах реалізації даного винаходу даний спосіб можуть здійснювати зі швидкістю, наприклад, 10–750 м³/година, переважно 50–450 м³/година, більше переважно 80–300 м³/година. Таким чином, переважно, щоб даний спосіб являв собою спосіб, у якому всі стадії виконуються безперервно (на відміну від періодичної дії), як наприклад, в "конфігурації з безперервною подачею та відводом", як

35 відомо фахівцям в даній області техніки.

Згідно з варіантами реалізації якщо вода після переробки бульбоплодів має високу

40 концентрацію білка, наприклад більше 1 мас. %, переважно більше 1,5 мас. %, спосіб переробки води після переробки бульбоплодів переважно включає попередню мікрофільтрацію з наступною діяфільтрацією, як описано вище. Переважно даний спосіб, крім усього іншого, включає стадію флокуляції, яку виконують або до, або після стадії мікрофільтрації. Відповідно до інших переважних варіантів реалізації воду після переробки бульбоплодів, крім усього

45 іншого, піддають стадії ультрафільтрації перед стадією діяфільтрації. У даному варіанті реалізації даного винаходу спосіб включає первинну ультрафільтрацію, за якою слідує стадія діяфільтрації. У додаткових варіантах реалізації даного винаходу діяфільтраційний ретентат може бути сконцентрований шляхом ультрафільтрації, виконаної перед висушуванням. Первинна та вторинна ультрафільтрація можуть бути виконані при тих же загальних умовах способу, як описано вище, але необов'язково, щоб етапи способу були ідентичними.

Оптимізований спосіб виділення нативного білка бульбоплодів з води після переробки

50 бульбоплодів, що містить високу концентрацію білка, включає або складається з етапів у зазначеному порядку: мікрофільтрація, флокуляція та діяфільтрація, або флокуляція, мікрофільтрація та діяфільтрація, або флокуляція, мікрофільтрація, ультрафільтрація та діяфільтрація або мікрофільтрація, ультрафільтрація та діяфільтрація. У найбільше переважних варіантах реалізації даного винаходу дана послідовність складається з етапів мікрофільтрації, ультрафільтрації та діяфільтрації. В альтернативному варіанті послідовність стадій включає або

55 складається з етапів флокуляції, мікрофільтрації, ультрафільтрації, діяфільтрації або стадій флокуляції, ультрафільтрації та діяфільтрації, за кожною з яких необов'язково може слідувати етап ультрафільтрації.

Усі перераховані стадії можуть бути виконані відповідно до параметрів, описаних у даній заявці. Згідно з варіантами реалізації за етапом флокуляції переважно слідує етап видалення

60 твердих частинок, переважно центрифугування. Усі варіанти реалізації даного винаходу

переважно доповнюють стадією видалення глікоалкалоїдів на будь-якому етапі способу. Кожний з цих способів може включати стадію висушування, якій необов'язково слідує стадія концентрування, переважно ультрафільтрації.

5 Згідно з варіантами реалізації якщо вода після переробки бульбоплодів має низьку концентрацію білка, наприклад менше 1,5, переважно менше 1 мас. %, спосіб попередньої обробки води після переробки бульбоплодів переважно включає стадію ультрафільтрації з наступною діалізацією, як описано вище. Переважно, даній послідовності стадій передують стадія мікрофільтрації. Більше того, переважно, щоб діалізаційний ретентат потім піддавали ультрафільтрації. Оптимізований спосіб виділення нативного білка бульбоплодів з води після переробки бульбоплодів, що містить низьку концентрацію білка, складається з наступних етапів: мікрофільтрація, ультрафільтрація, діалізація й, необов'язково, ультрафільтрація та/або висушування, відповідно до визначення у даній заявці, з додаванням етапу видалення глікоалкалоїдів у будь-який момент процесу.

10 Необов'язково, діалізаційний ретентат або концентрований розчин, отриманий шляхом ультрафільтрації діалізаційного ретентату, може бути підданий стадії фракціонування, як наприклад адсорбції або хроматографії. Дані способи поділу нативного білка бульбоплодів на фракцію інгібітора протеази, фракцію пататину або фракцію загального білка відомі. Таким чином, дані способи можуть застосовуватися з метою подальшого очищення загального ізоляту білка бульбоплодів або з метою одержання ізоляту інгібітора протеази або ізоляту пататину.

20 Однак у переважних варіантах реалізації даного винаходу виділення білка проводять без включення стадії адсорбції білка. Спосіб переважно не включає стадію адсорбції білка адсорбентом, при якій білок адсорбується на адсорбенті з високою спорідненістю (визначений як білок, що має більше високу спорідненість до адсорбенту, на відміну від інших компонентів оброблюваної рідини). Спосіб переважно не включає процес адсорбції-елюції білка або хроматографії білка, як наприклад, адсорбція у киплячому шарі, мембранна адсорбція або стадія хроматографії.

25 Крім того, спосіб переважно також не включає стадію денатурування. У найбільше переважних варіантах реалізації даного способу стежать за тим, щоб температура води після переробки бульбоплодів залишалася нижче 40 °C під час попередньої обробки, діалізації та будь-якої іншої стадії перед висушуванням. Це допомагає досягти стабільності в'язкості білкового розчину в часі, а також дозволяє уникнути денатурації білка. Крім того, даний спосіб переважно не включає додаткових стадій денатурування або стадії з більшим зусиллям зрушення, як наприклад, дроблення на мікрочастинки.

35 Виділення білка згідно з даним способом Даний спосіб має декілька переваг у порівнянні з відомими способами виділення ізоляту нативного білка бульбоплодів. На виході одержують білок більше чистий, менше зруйнований, менше денатурований (більше нативний) з поліпшеними функціональними властивостями. Крім того, білок не має стороннього присмаку та не викликає неприємного відчуття в роті.

40 Білок, виділений відповідно до даного способу, являє собою чистий нативний білок з високим вмістом білка. Він містить у відсотках від сухої речовини щонайменше 75 мас. % нативного білка бульбоплодів, переважно щонайменше 80 мас. % нативного білка бульбоплодів, більше переважно щонайменше 85 мас. % нативного білка бульбоплодів, ще більше переважно щонайменше 90 мас. % нативного білка бульбоплодів.

45 Здатність виділеного білкового порошку розчинятися у демінералізованій воді є заходом ступеня денатурації; денатурований білковий порошок не розчинний у воді, тоді як нативний білковий порошок розчинний у воді. Нативний білок бульбоплодів, виділений за допомогою даного способу (і згодом висушений), може бути розчинений у демінералізованій воді практично повністю. Це означає, що можна повторно розчинити у демінералізованій воді щонайменше 55 % виділеного білка, переважно щонайменше 65 % білка, більше переважно щонайменше 75 % білка, ще більше переважно щонайменше 85 % білка або навіть щонайменше 90 % білка.

50 Функціональні властивості, включаючи розчинність, порівнянні з властивостями білка, який зустрічається у природі (всередині бульбоплода). Крім того, виділення білка даним способом не впливає на емульгуючі властивості.

55 Крім того, білок містить щонайбільше 1,0 мас. % загальної кількості глюкози, фруктози і сахарози, щонайбільше 1 мас. % небілкових амінокислот бульбоплодів, щонайбільше 10 мг/кг, переважно щонайбільше 5 мг/кг сульфату, щонайбільше 200 мг/кг, переважно щонайбільше 100 мг/кг, більше переважно щонайбільше 50 мг/кг, ще більше переважно щонайбільше 25 мг/кг глікоалкалоїдів, щонайбільше 5 мг/кг важких металів, 10 які вибрані з групи, що складається з кадмію, ртуті, свинцю та миш'яку, і щонайбільше 10 мас. % хлоридних солей, переважно щонайбільше 5 мас. %. Переважно вміст золи становить менше 5 мас. %, переважно менше 3

мас. %, більше переважно менше 1 мас. %.

Низький вміст цукру та низький вміст вільних амінокислот важливі, тому що цукри, такі як глюкоза, фруктоза та сахароза, є відновлюючими цукрами, які в реакції з вільними амінокислотами можуть утворювати піразини, що є причиною неприємного смаку.

5 Переважно вміст цукру становить менше 1,0 мас. %, переважно менше 0,5 мас. %, більше переважно менше 0,1 мас. %, більше переважно менше 0,05 мас. % стосовно сухої маси композиції. Крім того, переважно, ізолят містить щонайбільше 1 мас. % вільних 20 амінокислот бульбоплодів, більше переважно щонайбільше 0,5 мас. % вільних амінокислот бульбоплодів, ще більше переважно щонайбільше 0,1 мас. % вільних амінокислот бульбоплодів, ще більше переважно щонайбільше 0,05 мас. % вільних амінокислот бульбоплодів стосовно сухої маси композиції.

10 Даний спосіб вигідно знижує кількість як цукрів, так і вільних амінокислот бульбоплодів. Крім того, дія фільтрація, проведена з використанням сольового розчину, забезпечує умови, при яких білок стабілізується та, таким чином, не розкладається або майже не розкладається під дією примусового механічного впливу при дія фільтрації. Це зводить до мінімуму утворення додаткових вільних амінокислот.

15 Крім того, даний спосіб зводить до мінімуму присутність сульфату в отриманому ізоляті білка бульбоплодів. Сульфат дестабілізує білкові розчини, однак зазвичай його додають у воду після переробки бульбоплодів при обробці крохмалю з метою запобігти окисненню й, отже, офарбуванню води після переробки бульбоплодів. Даний спосіб ефективно видаляє сульфати, що призводить до підвищеної стабільності в'язкості.

20 У переважних варіантах реалізації спосіб включає стадію видалення солей з ізоляту білка бульбоплодів, зокрема солей бульбоплодів, і/або солей, які були додані на стадії дія фільтрації. Це може бути досягнуто, згідно зі способами, описаними вище, в результаті чого утворюється білок з низьким вмістом золи, низьким вмістом калію, а також з низьким вмістом важких металів.

25 З метою ясності та короткого опису ознаки описані у даній заявці як частина тих же або окремих варіантів реалізації, однак слід розуміти, що обсяг винаходу може включати варіанти реалізації, що мають комбінації всіх або деяких описаних ознак. Нижче наведені ілюстративні приклади, які жодним чином не обмежують даний винахід.

30 ПРИКЛАДИ

Глікоалкалоїди (загальні глікоалкалоїди) визначають в основному згідно зі способом, зазначеним Лаусом й ін. (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").

35 Зразки розчиняють або розбавляють у 5 % розчині оцтової кислоти, що містить 20 мМ натрієвої солі гептансульфонової кислоти (VWR 152783K), протягом щонайменше 2 годин. Нерозчинні речовини видаляють центрифугуванням при 9000 g при температурі навколишнього середовища (Heraeus Multifuge 1 SR, ротор 75002006), і надосадову рідину фільтрують через шприцевий фільтр GHP Acrodisc 13 мм із мембраною GHP 0,45 мкм 20 безпосередньо у віалу для ВЕРХ об'ємом 1,5 мл (VWR 548-0004) і закривають алюмінієвою кришкою з обтискним краєм 11 мм, із септою гума/бутил/TEF (VWR 548-0010). Зразки автоматично вводять у колонку для твердофазної екстракції (Oasis HLB prospect-2/картридж Symbiosis 2,0 \times 10 мм, розмір частинок 30 мкм) через систему твердофазної екстракції Robotlon (Separations). Глікоалкалоїди елюють за допомогою колонки Hypersil ODS C18 (250 мм \times 4,6 мм; 5 мкм) і розділяють з додаванням 50 % ацетонітрил/фосфатного буфера з рН=7,6. Аналіти виявляють за допомогою УФ детектора Smartline 2520 (Knauer) і визначають їхню кількість з каліброваної кривої, побудованої для очищених глікоалкалоїдів (α -соланін, Carl Roth 4192,1 і α -чаконін Carl Roth 2826,1).

45 Метали виявляють методом мас-спектрометрії з індуктивно зв'язаною плазмою відповідно до ISO 17294-2:2016.

Елементний склад визначають за допомогою рентгенівської флуоресценції для всіх елементів з атомним номером вище, ніж у натрію, за допомогою спектрометра Rigaku CG ED-XRF (Rigaku).

50 Зольність визначають шляхом спалювання зразка при 550 °C і зважування залишку.

55 Вміст цукру визначають за допомогою набору Megazyme SuFrG відповідно до інструкцій виробника.

Кількість загальних зважених твердих частинок може бути визначена шляхом визначення оптичної щільності бульбоплодного соку з вмістом сухої речовини 4,5 мас. % 5 при довжині хвилі 620 нм.

60 Кількість розчинених твердих частинок може бути визначена шляхом вимірювання на

портативному цифровому рефрактометрі PAL alpha (AT 3840, Atago).

Оптичну щільність при 620 нм визначають шляхом розведення розчину до 5,0° за Бріксом (відповідає 4,5 мас. % сухої речовини) і центрифугування при 14000 об./хв. на 10 центрифугу Еррendorf протягом 10 хвилин з метою видалення нерозчинних речовин. Розчини зі значеннями Брікса нижче 5 центрифугували як є. Аліквоти по 1 мл надосадової рідини кожного розчину наливають у кювету та поміщають у спектрофотометр BioRad SmartSpec Plus. Оптичну щільність вимірюють двічі при 620 нм щодо контрольного зразка з демінералізованою водою.

Питома провідність може бути визначена за допомогою кондуктометра HI 98312 (Hanna Nindustries, Нідерланди) при кімнатній температурі, що добре відомо в даній області техніки. Питома провідність також може бути визначена розрахунковим способом, де це необхідно, на основі різних концентрацій розчинених речовин, як відомо в даній області техніки.

Концентрація білка може бути визначена за методом Кьельдалі. Потім азотне число перетворюється у вміст білка шляхом множення на 6,25.

Вміст чистого білка визначають за допомогою експрес-аналізатора білка Sprint (CEM). Даний спосіб заснований на взаємодії негативно зарядженого барвника (iTAG) з позитивно зарядженими амінокислотами (лізин, аргінін і гістидин), присутніми у білку в кислому середовищі. Гідрофобна природа барвника викликає осадження білків, а втрата адсорбції барвника при 480 нм переводиться у вміст білка за допомогою каліброваної кривої, побудованої на основі аналізу Кьельдалі, який був проведений на ретельно очищених білкових препаратах. Азотисті сполуки, такі як окремі амінокислоти та низькомолекулярні пептиди, не осаджуються у розчині барвника та, як наслідок, не впливають на вимірювання вмісту білка.

Вологість позначається як втрата маси при висушуванні та визначається шляхом поміщення алюмінієвого піддона зі зразком (VWR 611-9000), що містить від 1 до 10 грамів зразка, у галогенну сушарку HG83 (Mettler Toledo) при температурі 100 °C протягом 10 хвилин.

В експериментах при діалізації часто використовують наступні сольові розчини: 0,5 мас. % NaCl (питома провідність 8,2 мСм·см⁻¹); 0,5 мас. % KCl (питома провідність 8,2 мСм·см⁻¹); 0,33 мас. % NaCl (питома провідність 5,3 мСм·см⁻¹).

Визначення білкового складу за допомогою системи Experion

Білковий склад визначають за допомогою автоматичної системи електрофорезу Experion Pro260 (Bio-Rad, США). Спочатку температуру реагентів доводять до кімнатної та протягом нетривалого часу струшують, після чого реагенти центрифугують на центрифугу при 10000 x g протягом 5 хвилин. Потім готують розчини гелю та гель-барвника, перший з яких не потребує змішування реагентів, а другий готують шляхом змішування 20 мкл барвника з 520 мкл гелевого реагенту. Потім обидва розчини струшують та центрифугують при 10000 x g протягом 5 хвилин у центрифугу Еррendorf, оснащеної фільтром 0,2 мкм. Далі готують буфер для зразка шляхом змішування 30 мкл буфера для зразка з 1 мкл β-меркаптоетанолу. Потім зразки і маркер готують шляхом змішування 4 мкл зразка/маркера з 2 мкл буфера для зразків з наступним струшуванням і 15 центрифугуванням при 10000 x g протягом 5 хвилин. Потім зразок і маркер розбавляють 84 мкл надчистої води. Чип Experion заповнюється 12 мкл розчину гель-барвника на станції заправлення, з виконанням програми В3. Потім 12 мкл гель-барвника та гелевого розчину накачують у відповідні лунки для чипа. 6 мкл маркера накачують у поглиблення на чипі Experion. Потім по 6 мкл кожного зразка завантажують у лунки для зразків 1-10. Нарешті, аналіз починається із завантаження експериментального чипа в Experion Pro260 і запуску аналізу Protein 260. Після проведення аналізу електроди очищають за допомогою чипа, що чистить.

Приклад 1

Вплив концентрації солі на здатність білка до агрегування й осадження оцінюють за допомогою модельних розчинів при різних значеннях рН і питомої провідності. Модельний розчин містить очищений інгібітор протеази й очищений пататин (отриманий шляхом хроматографії та підданий інтенсивному діалізу).

Білок розчиняють до загальної концентрації білка 1 мас. % у співвідношенні 1:1 за 30 масою очищеного інгібітора протеази й очищеного пататину в 30 мМ цитратному буфері калію. При необхідності рН регулюють шляхом додавання HCl (1 М) або NaOH (1 М). Питому провідність встановлюють на значенні 2, 12 або 50 мСм·см⁻¹ шляхом додавання хлориду калію. Зразки витримують при температурі навколишнього середовища протягом 1 години і центрифугують протягом 10 хвилин зі швидкістю 14000 об./хв. на центрифугу Еррendorf з метою видалення осадженого білка. Надосадову рідину розбавляють у 25 разів шляхом додавання 100 мМ розчину NaOH. Концентрацію білка вимірюють при 280 нм на спектрофотометрі BioRad SmartSpec Plus відносно 100 мМ бланкового розчину NaOH і виражають у відсотках розчинного білка. Результати показують сильну залежність розчинності картопляного білка від рН при

низькій питомій провідності, у той час як при більшє високій питомій провідності рівень рН зменшується або стає рівним нулю (див. ФІГ. 1).

Приклад 2

5 Вплив концентрації солі на здатність білка до агрегування й осадження під дією механічних напруг оцінюють за допомогою модельних розчинів при різних значеннях рівня рН і питомої провідності. Модельний розчин містить очищений інгібітор протеази й очищений пататин (отриманий хроматографією та підданий інтенсивному діалізу) у молярному співвідношенні 1:1.

10 Білок розчиняють при концентрації загального білка 2 і 6 мас. % у 10 мМ цитратному буфері. Буфер розбавляють розчином NaOH або HCl з метою доведення рівня рН до 6,0 або 7,0. До отриманого розчину додають твердий KCl, щоб установити питому провідність 2, 5, 12 і 50 мСм·см⁻¹. Розчини центрифугують протягом 5 хвилин при 10,000 x g з метою видалення нерозчинного білка, а потім установлюють кінцеву концентрацію білка (калібровану за фракцією білкового ізоляту) 1,5 і 4 мас. %. Розчинність білка визначають для кожної фракції окремо та потім усереднюють з метою відобразити природну мінливість картопляного соку.

15 Отриманий білковий розчин витримують протягом 1 години при кімнатній температурі, інтенсивно перемішуючи за допомогою механічної мішалки з метою імітації механічних напруг, що виникають при діяфільтрації. Потім суміш білків центрифугують протягом 5 хвилин при 10,000 x g і визначають концентрацію білка у надосадовій рідині. Втрати білка в результаті агрегації розраховують за різницею між вихідною концентрацією білка та кінцевою концентрацією білка. Результати показані на ФІГ. 2.

20 Результати показують, що загальний картопляний білок добре розчинний при підвищеній питомій провідності навіть під дією механічних напруг. Питома провідність 30 повинна становити щонайменше 5 мСм·см⁻¹, переважно щонайменше 8 мСм·см⁻¹. З метою уникнення надмірного додавання солі при діяфільтрації, питома провідність переважно повинна бути нижче 20 мСм·см⁻¹, більше переважно нижче 18 мСм·см⁻¹. Переважна питома провідність становить 8–15 мСм·см⁻¹, переважно 9–14 мСм·см⁻¹.

Приклад 3

30 Воду після переробки бульбоплодів, отриману з бульбоплодів картоплі після видалення крохмалю та волокон (картопляний сік) застосовують в якості сировини для одержання загального ізоляту нативного білка в експериментальному масштабі. Картопляний сік піддають попередній обробці з метою видалення твердих частинок ((а) і 5 (б)) або попередній обробці шляхом флокуляції з наступним видаленням твердих частинок (в). У всіх випадках обробка відбувається при швидкості потоку від 100 до 250 л·(год·м²)⁻¹.

35 (а) Картопляний сік центрифугують у звичайному тарілчастому сепараторі. Подальше видалення частинок здійснюють шляхом тупикової фільтрації із застосуванням 10 діатомітової землі в якості допоміжного фільтруючого середовища. Центрифугований картопляний сік зберігають в резервуарі до подальших стадій попередньої обробки.

40 (б) Картопляний сік піддають стадії мікрофільтрації за допомогою керамічних мембран з розміром пор 0,8 мкм при температурі 23±2 °С з постійним робочим потоком 100 л·(год·м²)⁻¹. Мікрофільтрований картопляний сік зберігають в резервуарі до 15 подальших стадій попередньої обробки.

45 (в) Картопляний сік попередньо обробляють сумішшю катіонних й аніонних флокулянтів, як описано у WO 2016/036243A1. Тверді частинки відокремлюють від картопляного соку в тарілчастій центрифугі. Осад на дні центрифуги видаляють, а надосадову рідину використовують як сировину для діяфільтрації. Зразки флокульованого картопляного соку готують з урахуванням модифікованого показника ущільнюваності об'єму осаду як показника якості флокуляції. Також перевіряють оптичну щільність надосадової рідини при 620 нм. Флокульований картопляний сік зберігають в резервуарі до подальших стадій попередньої обробки.

50 Характеристики даних стадій попередньої обробки показані в Таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристики води після переробки картоплі після різних стадій попередньої обробки

Швидкість вхідного потоку картопляного соку (л·год. ⁻¹)	Показник ущільнюваності об'єму осаду (мл·г ⁻¹)	Оптична щільність при 620 нм
100	49	0,077
150	64	0,076
200	63	0,082
250	71	0,104

5 Попередньо оброблений у такий спосіб картопляний сік необов'язково піддають стадії видалення глікоалкалоїдів. Видалення глікоалкалоїдів проводять за допомогою колонки, наповненої гранульованим активованим вугіллям (С-GRAN, Norit). Колонку з активованим вугіллям попередньо замочують у демінералізованій воді на 24 години перед проведенням стадії видалення глікоалкалоїдів. Попередньо оброблений картопляний сік 5 пропускають через колонку при тривалості контакту 2 години.

10 У всіх випадках попередня обробка, крім усього іншого, включає стадію ультрафільтрації, що передусім стадії діафільтрації. Картопляний сік піддають ультрафільтрації за допомогою мембрани зі спіральним намотуванням, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 5 кДа, з одержанням концентрованого 10 розчину картопляного білка з вмістом розчинених твердих частинок від 9,9 до 21,8° за Бріксом.

Таблиця 2

Способи обробки й умови одержання ізоляту нативного білка

Експерименти		1	2	3	4	5	6	7
Попередня обробка		МФ, УФ	МФ, УФ	Флок., Центр., УФ	Центр., УФ	Флок., Центр., УФ	Флок., Центр., УФ	Флок., Центр., УФ
		б	б	в	а	в	в	в
Робочий потік при МФ	(л·(год·м ²) ⁻¹)	100,0	100,0					
МФ ТМТ*	(·10 ⁵ Па)	0,5–2,5	0,5–2,5					
Робочий потік при УФ	(л·(год·м ²) ⁻¹)	10,0	13,0	12,0	13,8	12,4	12,6	13,2
Т	(°С)	16,4	21,9	21,0	22,5	21,5	19,8	1,02– 1,06
УФ ТМТ поч.-кін.	(·10 ⁵ Па)	1,04– 1,07	1,04– 1,06	–	1,05– 1,07	1,02– 1,06	1,02– 1,05	15,7
Тв. частинки поч.-кін.	(° за Бріксом)	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 поч.-кін.	(мСм·см ⁻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
Діафільтрація								
УДФ:УКС	–	3:1	4:1	3:1	3:1	4:1	3:1	3:1
[Сіль]	(%)	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,66	0,33
Масова витрата	(л·(год·м ²) ⁻¹)	13,0	8,5	10,0	14,9	9,0	14,2	8,8
ТМТ* поч.-кін.	(·10 ⁵ Па)	1,05–	1,04–	–	1,03–	1,04–	1,02–	1,02– 1,05

15

		1,12	1,1		1,12	1,09	1,09	
T	(°C)	18,5	20,5	22,0	24,7	22,7	22,6	18,5
Тв. частинки поч.-кін.	(° за Бріксом)	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 поч.-кін.	(мСм·см ⁻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
Видалення глікоалкалоїдів		Так	Ні	Так	Так	Так	Так	Так
Висушування		Розп.	Розп.	Розп.	Розп.	Розп.	Розп.	Вимор.
Аналіз								
Білок, визначений за методом Кьельдалі	(%)	84,8	80,7	83,7	81,1	85,5	82,2	79,0
Молекулярна маса < 35 кДа	(%)	58,1	55,0	77,4	81,6	66,1	83,2	54,2
Вологість	(%)	7,73	6,95	8,43	9,24	5,51	7,72	7,62
Загальний вміст глікоалкалоїдів	(·10 ⁻⁶)	120	475	–	43	96,5	26	48
Сульфіти	(·10 ⁻⁶)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	7,0
Загальне кількість важких металів	(·10 ⁻⁶)	0,53	0,69	0,61	1,19	0,73	0,79	0,59

*ТМТ: трансмембранний тиск

Ретентат після ультрафільтрації піддавали подальшій обробці, яка включає діафільтрацію, проведenu з використанням сольового розчину, що містить 0,33 або 0,66 мас. % NaCl, при різних відношеннях вихідної рідини до сольового розчину (1:3–1:4). В результаті був отриманий розчин ізоляту картопляного білка. При ультрафільтрації та 5 діафільтрації рівень рН залишався рівним 6,3±0,3. Кінцеві концентрати висушували шляхом висушування розпиленням (T_{поч.} = 175 °C, T_{кін.} = 75 °C) або шляхом висушування виморожуванням. Результати наведені в таблиці 2.

Ізолят картопляного білка, отриманий ультрафільтрацією та діафільтрацією з використанням сольового розчину, характеризують за питомою провідністю та концентрацією розчинених твердих частинок (° за Бріксом). Висушений продукт аналізують на вміст білка (за Кьельдалі), вологість, відносну кількість інгібітора протеази, вміст глікоалкалоїдів, сульфідів і важких металів.

У таблиці 2 показаний вплив різних параметрів способу на якість білкового ізоляту. Всі можливі стадії попередньої обробки можуть бути успішно застосовані до проведення

діафільтрації, але вони не виявляють значного впливу на якість кінцевого концентрованого водного ізоляту білка або висушеного продукту за умови, що діафільтрація проводиться з використанням сольового розчину. Стадія видалення глікоалкалоїдів необхідна для одержання картопляного білка з потрібним низьким рівнем загального вмісту глікоалкалоїдів.

Результати експерименту свідчать про те, що при діафільтрації води після переробки картоплі з більше високим коефіцієнтом розведення (1:4), питома провідність ізоляту білка нижче, ніж в експериментах з коефіцієнтом розведення 1:3. Після висушування продукт із експерименту 5 також має найвищий вміст білка.

При збільшенні концентрації солі з 0,33 % до 0,66 %, як це було зроблено в експерименті 6, питома провідність ізоляту білка підвищується. Однак вміст глікоалкалоїдів у висушеному ізоляті білка в експерименті 6 нижче, ніж в інших експериментах. З даних таблиці видно, що ізолят білка може бути висушений різними способами, як наприклад висушування розпиленням (експерименти 1-6) або висушування виморожуванням (експеримент 7). У всіх випадках був отриманий продукт із високим вмістом білка від 79 % до 85,5 %.

Приклад 4

Воду після переробки бульбоплодів, отриману з бульбоплодів картоплі після видалення крохмалю та волокон (вода після переробки картоплі), використовують в якості сировини для виробництва нативного загального ізоляту білка картоплі в експериментальному масштабі. Воду після переробки картоплі попередньо очищують від твердих частинок шляхом мікрофільтрації за допомогою керамічних мембран з розміром пор 0,8 мкм при температурі

23±2 °C і постійному робочому потоці 100 л·(год·м²)⁻¹. Мікрофільтровану воду після переробки картоплі зберігають в резервуарі до подальших стадій переробки.

У всіх випадках мікрофільтрований картопляний сік (4,2–5,0° за Бріксом і 12 мСм·см⁻¹) піддають ультрафільтрації за допомогою поліетилсульфонової мембрани, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 5 кДа або 50 кДа. Це призводить до одержання ретентату з вмістом розчинених твердих частинок від 10,5 до 28,2° за Бріксом і питомою провідністю від 10 до 16 мСм·см⁻¹.

Далі ультрафільтрований ретентат картопляного соку піддають стадії видалення глікоалкалоїдів. Необов'язково, ретентат розбавляють м'якою водою перед видаленням глікоалкалоїдів з одержанням білкового розчину з вмістом розчинених твердих частинок від 10,5 до 12,9° за Бріксом і питомою провідністю від 6 до 13 мСм·см⁻¹. Стадію видалення глікоалкалоїдів проводять за допомогою чотирьох колонок, заповнених гідрофобною смолою, при кімнатній температурі та рівні рН 6–6,5. Після видалення глікоалкалоїдів одержують розчин білка з питомою провідністю 8–13 мСм·см⁻¹, який необов'язково концентрують до вмісту твердих речовин у діапазоні 12–18° за Бріксом.

Потім ультрафільтраційний ретентат піддають подальшій обробці, яка включає 5 декілька стадій діафільтрації з використанням сольового розчину, що містить 0,5 мас. % NaCl або KCl, з питомою провідністю 8,2 мСм·см⁻¹ при різних відношеннях вихідної рідини (картопляний сік VKC) до сольового розчину (ВДФ) (1:1–1:2). В результаті одержують розчин ізоляту картопляного білка. Кінцеві концентрати необов'язково піддають висушуванню розпиленням (Т_{поч.} = 175 °C, Т_{кін.} = 75 °C). Кожна стадія 10 діафільтрації спричиняє розведення об'єму розчину білка VKC з об'ємом діафільтрації ВДФ у зазначеному співвідношенні, і концентрування розведеного розчину білка до вихідного об'єму шляхом ультрафільтрації. Результати представлені в таблиці 3.

Ізолят картопляного білка, отриманий шляхом ультрафільтрації та діафільтрації з використанням сольового розчину, характеризують за концентрацією розчинених твердих частинок (° за Бріксом). Кінцевий продукт аналізують на вміст білка, вологість, відносну кількість інгібітора протеази, вміст глікоалкалоїдів, сульфату та важких металів.

У таблиці 3 показаний вплив різних параметрів процесу на якість білкового ізоляту. Всі можливі види попередньої обробки можуть бути успішно застосовані до початку діафільтрації. Крім того, були поставлені експерименти з проведення діафільтрації в різних умовах, з яких слідує, що білковий ізолят гарної якості може бути отриманий із застосуванням різних сольових розчинів.

Результати експериментів 8 і 9 показують, що діафільтрація при концентрації солі 0,5 % NaCl і відношенні білкового розчину до діафільтрату 1:1 або 1:2 і 1:1, відповідно, може бути виконана з одержанням ізоляту картопляного білка гарної якості (84–86 %). На ФІГ. 6 показано, що отриманий загальний білковий ізолят містить всі білкові фракції, які також присутні у вихідній рідині.

В експерименті мікрофільтрований і ультрафільтрований картопляний сік піддають п'яти окремим стадіям діафільтрації (двом перед стадією видалення глікоалкалоїдів і трьом після видалення глікоалкалоїдів) з додаванням 0,5 % KCl. Дані умови дозволяють одержати білковий ізолят аналогічної якості у порівнянні з випадком, коли при діафільтрації використовують сіль NaCl (див. ФІГ. 6).

Крім того, результати експерименту 11 показують, що якість ізоляту нативного білка може бути покращена при використанні УФ і ДФ мембрани, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 50 кДа, замість 5 кДа. Такі умови дозволяють одержати білковий ізолят з вмістом чистого білка 94 % у порівнянні з випадком (приблизно 84 %), коли використовується мембрана, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 5 кДа (див. експерименти 8 і 9). Отриманий загальний білковий ізолят містить всі білкові фракції, які також присутні у вихідній рідині (мікрофільтрований картопляний сік) (див. ФІГ. 6).

Таблиця 3

	Од. вим.	8	9	10	11
Попередня обробка		МФ, УФ	МФ, УФ	МФ, УФ, ДФ	МФ, УФ
УФ мембрана	кДа	5	5	5	50
pH поч.-кін.		5,9–6,1	5,9–6,3	6,1–6,6	6,2–6,5
Тв. частинки поч.-кін	° за Бріксом	4,8–10,5	4,6–120,2	4,2–19	5,0–28,2
σ поч.-кін.	мСм·см ⁻¹	12–13	12–13	12–16	12–10
Розведення		Ні	Так	Так	Так
Тв. частинки	° за Бріксом		12,9	12,4	10,9
σ	мСм·см ⁻¹		10	9	6
Діафільтрація					
ДФ мембрана	кДа	5	5	5	50
V _{ДФ} :V _{КС}		1:1	2:1, 1:1	1:1	1:1
Кількість ДФ стадій		5	2, 1	5	5
ДФ сіль		NaCl	NaCl	KCl	NaCl
ДФ [Сіль]	(мас. %)	0,5	0,5	0,5	0,5
pH поч.-кін		6,1–6,2	6,3–6,6	6,6–6,7	6,5–6,5
Тв. частинки поч.-кін	° за Бріксом	10,5–14,9	12,9–12,1	12,4–12,9	10,9–18,0
σ поч.-кін.	мСм·см ⁻¹	13–9	13–9	9–10	8–7
Висушування		розпилення	розпилення	розпилення	розпилення
Аналіз					
Чистий білок	мас. %	85,7	84	83	94
Молек. маса < 35 кДа	%		56	58	54
ЗВА	мас. %	–	86	84	94
Цукор (загальна кількість)	мас. %	<0,5	<0,5	<0,54	<0,55
ЗВВА	мас. %	0,83	0,56	0,05	0,98
Сульфіти	мг/кг	7,4			
Загальний вміст глікоалкалоїдів	мг/кг	142,8	112	27	39
Кадмій	мг/кг	0,54	0,24	0,47	0,51
Ртуть	мг/кг	<0,025	<0,01	<0,01	<0,01
Свинець	мг/кг	0,2	0,28	0,20	<0,1
Миш'як	мг/кг	0,04	0,07	0,06	0,06
Фосфор	мг/кг	–	5761	5721	2797
Сірка	мг/кг	–	14482	13269	13916
Хлор	мг/кг	–	24524	15865	15245
Калій	мг/кг	–	6025	55385	6014
Кальцій	мг/кг	–	2061	1154	280
Залізо	мг/кг	–	301	323	329
Мідь	мг/кг	–	80	67	57
Зола (сировина)	мас. %	6,5	8,2	9,3	4,2

*ЗВА: загальний вміст азоту; ЗВВА: загальний вміст вільних амінокислот

Приклад 5

5 Воду після переробки бульбоплодів, отриману з бульбоплодів картоплі після видалення крохмалю та волокон (вода після переробки картоплі) використовують в якості 5 сировини для одержання ізоляту нативного інгібітора картопляного білка в експериментальному масштабі. Воду після переробки картоплі попередньо очищують від твердих частинок шляхом

мікрофільтрації за допомогою керамічних мембран з розміром пор 0,8 мкм при температурі 23±2 °С і з постійною масовою витратою 100 л·(год·м²)⁻¹. Мікрофільтровану воду після переробки картоплі зберігають в резервуарі до подальших 10 стадій переробки.

5 Мікрофільтрований картопляний сік піддають ультрафільтрації за допомогою мембрани з поліетилсульфону, номінальне відсікання за молекулярною масою якої становить 5 кДа, з одержанням розчину картопляного білка з вмістом розчинених твердих речовин 19,2° за Бріксом. 15

Потім рівень рН ультрафільтрованого картопляного соку доводять до 3,0 за допомогою додавання по краплях 1 М розчину НСІ при перемішуванні з утворенням 33

10 суспензії через осадження фракції пататину картопляного соку. Суспензію центрифугують зі швидкістю 4200 об./хв. протягом 10 хвилин і декантують. З надосадової рідини видаляють глікоалкалоїди за допомогою чотирьох колонок, заповнених гідрофобною смолою, при кімнатній температурі та рівні рН близько 3,5, а потім концентрують. Концентрат піддають діафільтрації за допомогою мембрани, номінально затримувана 5 молекулярна маса якої становить 6 кДа, з 15 трикратним додаванням цитратного буфера з рН 3,5, з наступним трикратним додаванням 0,5 % розчину КСІ (відношення концентрату до діафільтрату становить 5:3) з одержанням розчину білка з 5,3° за Бріксом і вмістом інгібітора протеази 90 % (див. також ФІГ. 6).

20 Результати наведені в таблиці 4. Показано, що регулювання рівня рН до 10 проведення діафільтрації забезпечує одержання білкового ізоляту гарної якості, що відображається у вмісті чистого білка 81,4 %. Крім того, показано, що даний спосіб дозволяє одержати ізолят нативного картопляного білка, який збагачений фракцією інгібітора протеази картоплі.

Таблиця 4

	Од. вим.	12
Попередня обробка		МФ, УФ, рН, видалення тв. частинок
УФ мембрана	кДа	5
рН поч.-кін.		6,0–3,1
тв. частинки поч.-кін.	° за Бріксом	4,8–8,3
σ поч.-кін.	мСм·см ⁻¹	12–23
Діафільтрація		
Мембрана	кДа	6
УДФ:УКС		3:5
Сіль		КСІ
[Сіль]	(%)	0,5
рН поч.-кін.		3,1–3,7
тв. частинки поч.-кін.	° за Бріксом	8,3–5,3
σ поч.-кін.	мСм·см ⁻¹	23–7
Висушування		немає
Аналіз		
Чистий білок	мас. %	81,4
Молек. маса < 35 кДа	%	90
Загальний вміст азоту	мас.%	81,4
Загальний вміст глікоалкалоїдів	мг/кг	118
Кадмій	мг/кг	<0,23
Ртуть	мг/кг	<0,23
Свинець	мг/кг	<2,3
Миш'як	мг/кг	<1.2
Фосфор	мг/кг	814
Сірка	мг/кг	14535
Хлор	мг/кг	43023
Калій	мг/кг	52326
Кальцій	мг/кг	1395
Залізо	мг/кг	277
Мідь	мг/кг	133
Зола (сировина)	мас.%	9,3

Приклад 6

Мікрофільтрований картопляний сік (300 л) піддають ультрафільтрації за допомогою

мембрани, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 5 кДа, з одержанням концентрованого розчину білка (35 л, 22,7° за Бріксом). Концентрований розчин білка піддають діафільтрації з додаванням 50 л води (відношення концентрату до діафільтрату становить 7:10). Питома провідність зменшується з 12 мСм·см⁻¹ (до додавання води) до 6,2 мСм·см⁻¹ (після додавання води). Діафільтрований розчин знову концентрують (35 л) з додаванням 50 л води, що призводить до подальшого зменшення провідності до 3,5 мСм·см⁻¹. При додаванні води утворюється білий осад, внаслідок чого розчин міняє свою консистенцію з прозорої помаранчевого кольору на мутну білого кольору, що вказує на осадження білка. Далі NaCl (250 г) додають для одержання прозорого помаранчевого розчину, що призводить до збільшення провідності до 8 мСм·см⁻¹.

Залежність питомої продуктивності від вмісту білка показана на ФІГ. 3. З даної залежності слідує, що питома продуктивність зменшується на 50 % після додавання другого об'єму води, що вказує на засмічення мембрани. Питома продуктивність відновлюється після додавання NaCl, що вказує на те, що білок знову солюбілізований.

Дані результати демонструють те, що важливо підтримувати питому провідність розчину білка вище щонайменше 5 мСм·см⁻¹, переважно щонайменше 8 мСм·см⁻¹, з метою уникнення осадження білка, що веде як до втрати білка, так і до забруднення та засмічення мембран. Цієї мети можна досягти, контролюючи питому провідність попередньо обробленої води після переробки бульбоплодів і/або контролюючи питому провідність сольового розчину.

Приклад 7

Воду після переробки бульбоплодів, отриману з солодкої картоплі й очищених бульбоплодів касави після видалення крохмалю та волокон (вода після переробки солодкої картоплі та касави), використовують в якості сировини для одержання нативного ізоляту загального білка. Воду після переробки піддають стадії видалення твердих 10 частинок, яка полягає в ультрафільтрації за допомогою комірки для ультрафільтрації Amicon M-2000, оснащеної мембраною, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 10 кДа.

Ультрафільтрований сік солодкої картоплі потім піддають діафільтрації за допомогою мембрани, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 10 кДа, з додаванням 0,5 % розчину NaCl (відношення концентрату до діафільтрату становить 1:5). Концентрат піддають двом додатковим стадіям діафільтрації з додаванням 0,5 % розчину NaCl (відношення концентрату до діафільтрату становить 1:2 і 1:1, відповідно) з одержанням розчину білка.

Ультрафільтрований очищений сік касави піддають діафільтрації за допомогою мембрани, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 10 кДа, з додаванням 0,5 % розчину NaCl (відношення концентрату до діафільтрату становить 1:1,5) з одержанням розчину білка.

Хімічний склад обробленого бульбоплодного соку показаний в таблиці 5 у порівнянні з необробленим соком.

Таблиця 5

		Сік солодкої картоплі (сировина)	ДФ концентрат	Сік касави (сировина)	ДФ концентрат
Цукор	г/кг СВ	122	30	767	388
Мінеральні речовини	г/кг СВ			278	136
Зола	г/кг СВ	н.в.	146	н.в.	167
Калій	г/кг СВ	23	н.в.	218	75
Хлор	г/кг СВ	6	86	6	33
Азот, визначений за методом				307	241
Кьельдалі (N*6,25)	г/кг СВ	85	669		
Вільні амінокислоти	г/кг СВ	12	н.в.	87	9
Чистий білок	г/кг СВ	35	551	119	178

н.в.: не виявлений

Результати показують, що даний спосіб дозволяє одержати сік з нативних бульбоплодів з

високим вмістом нативного білка. В обох випадках спостерігалось значне збільшення вмісту чистого білка, у той час як кількість забруднюючих речовин, таких як цукор і вільні амінокислоти, була суттєво знижена. 5

Приклад 8

5 З метою перевірки розчинності білка при природньому рівні рН (6–6,3) і при різній питомій провідності використовують загальний картопляний білок, що містить інгібітор протеази і пататин. Картопляний білок одержують шляхом мікрофільтрації картопляного 10 соку, ультрафільтрації до 10 % від первинного об'єму та діафільтрації згідно з описом прикладу 4 (експеримент 8) без висушування розпиленням і з додаванням чистої води до тих пір, поки 10 питома провідність ретентату не досягне 8 мСм·см⁻¹.

Отриманий водний картопляний білок розбавляють водними розчинами NaCl, питома провідність яких становить 3,7, 5,3, 6,7, 9,2 і 14 мСм·см⁻¹, з одержанням розчинів з 15 концентрацією білка 1,3 мас. %. Крім того, розчин картопляного білка з питомою провідністю 1,3 мСм·см⁻¹ та концентрацією білка 1,3 мас. % одержують при розведенні чистою водою.

15 Потім розчини перемішують протягом 1 години перед центрифугуванням. Концентрацію білка у надосадовій рідині визначають за допомогою експрес-аналізатора білка Sprint і порівнюють з вихідним концентратом білка. Результат показаний на ФІГ. 4.

Даний експеримент показує, що осадження білка у водній суміші, що містить інгібітор протеази і пататин, є неприйнятним, коли питома провідність падає нижче мСм·см⁻¹. Питома провідність при діафільтрації необхідно постійно підтримувати вище 5 мСм·см⁻¹, а більше переважно вище 8 мСм·см⁻¹. 20

Приклад 9

Білковий ізолят, описаний у прикладі 8, піддають діафільтрації з використанням розчинів NaCl, питома провідність яких становить 1,34, 3,65, 4,72, 5,25, 6,72, 8,72, 9,2, 12, 14 і 49,5 мСм·см⁻¹. 25

Результати показані на ФІГ. 5. Діафільтрація, проведена з використанням сольового 10 розчину, питома провідність якого становить менше 5 мСм·см⁻¹, призводить до неприпустимого осадження. Збільшення питомої провідності до значення більше 5 мСм·см⁻¹, переважно більше 8 мСм·см⁻¹, забезпечує прийнятне виділення білка, що дозволяє одержати поліпшені білкові 30 продукти.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб виділення нативного білка бульбоплодів, що містить нативний інгібітор протеази і нативний пататин, який включає: 35

а) переробку щонайменше одного бульбоплода з одержанням води після переробки бульбоплодів, що містить нативний білок бульбоплодів, що містить нативний інгібітор протеази і нативний пататин;

40 б) попередню обробку зазначеної води після переробки бульбоплодів, яка включає одну або більше з наступних стадій:

ба) концентрування;

бб) розведення;

бв) регулювання рівня рН;

бг) флокуляцію;

45 бд) видалення твердих частинок;

бе) термічну обробку;

де в результаті попередньої обробки питома провідність попередньо обробленої води після переробки бульбоплодів, що містить нативний інгібітор протеази і нативний пататин, становить 2-20 мСм·см⁻¹;

50 в) стадію діафільтрації попередньо обробленої води після переробки бульбоплодів з використанням сольового розчину, питома провідність якого становить щонайменше 5 мСм·см⁻¹, за допомогою 3-500 кДа мембрани, з одержанням, таким чином, зазначеного нативного ізоляту білка бульбоплодів як діафільтраційного ретентату.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що ізолят нативного білка бульбоплодів являє собою загальний ізолят нативного білка бульбоплодів, визначений як ізолят, що містить весь білок 55 бульбоплодів у нативній формі.

3. Спосіб за п. 1 або 2, який **відрізняється** тим, що спосіб додатково включає стадію видалення глікоалкалоїдів з одержанням ізоляту білка бульбоплодів, що містить не більше 200 мг/кг глікоалкалоїдів.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що стадію видалення глікоалкалоїдів виконують як частину стадії б) або після стадії в).
5. Спосіб за будь-яким із пп. 1-4, який **відрізняється** тим, що зазначена переробка для одержання води після переробки бульбоплодів включає перетирання, приготування пюре, подрібнювання на тертці, дроблення, пресування або нарізування бульбоплодів і, необов'язково, об'єднання з водою.
6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що зазначена переробка додатково включає стадію видалення крохмалю, таку як декантування, центрифугування, циклонування або фільтрація.
7. Спосіб за будь-яким із пп. 1-6, який **відрізняється** тим, що щонайменше один бульбоплід очищають від шкірки перед переробкою.
8. Спосіб за будь-яким із пп. 1-7, який **відрізняється** тим, що видалення твердих частинок включає стадії фільтрації, центрифугування, циклонування, декантування та/або мікрофільтрації, переважно стадію мікрофільтрації.
9. Спосіб за будь-яким із пп. 1-8, який **відрізняється** тим, що попередня обробка включає стадію концентрування, вибрану з ультрафільтрації, зворотного осмосу та/або концентрування виморожуванням, переважно стадію ультрафільтрації.
10. Спосіб за будь-яким із пп. 1-9, який **відрізняється** тим, що стадія ультрафільтрації передусе стадії діафільтрації.
11. Спосіб за будь-яким із пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що попередня обробка включає у будь-якому порядку стадію ультрафільтрації та стадію мікрофільтрації.
12. Спосіб за будь-яким із пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що діафільтрацію проводять за допомогою мембран, номінально затримувана молекулярна маса яких становить 5-300 кДа, переважно 5-50 або 50-200 кДа.
13. Спосіб за будь-яким із пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що діафільтрацію проводять з використанням сольового розчину, що містить хлорид, переважно NaCl, KCl або CaCl₂.
14. Спосіб за будь-яким із пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що питома провідність сольового розчину становить 5-20 мСм·см⁻¹, переважно 5-18 мСм·см⁻¹, більше переважно 8-14 мСм·см⁻¹, ще більше переважно 9-11 мСм·см⁻¹.
15. Спосіб за будь-яким із пп. 1-14, який **відрізняється** тим, що рівень рН при діафільтрації нижче 4,0 або вище 5,5, переважно вище 6,0.
16. Спосіб за будь-яким із пп. 1-15, який **відрізняється** тим, що діафільтраційний ретентат піддають стадії ультрафільтрації з одержанням концентрованого ізоляту білка бульбоплодів.
17. Спосіб за будь-яким із пп. 9-11 або 16, який **відрізняється** тим, що будь-яку стадію ультрафільтрації проводять за допомогою мембрани, номінально затримувана молекулярна маса якої становить 5-300 кДа, переважно 30-200 кДа, більше переважно 40-120 кДа, ще більше переважно 50-100 кДа.
18. Спосіб за будь-яким із пп. 1-17, який **відрізняється** тим, що в результаті первинної діафільтрації або ультрафільтрації утворюється пермеат, що містить вільні амінокислоти бульбоплодів.
19. Спосіб за п. 18, який **відрізняється** тим, що пермеат потім висушують, переважно шляхом висушування розпиленням і/або висушування виморожуванням, з одержанням композиції вільних амінокислот бульбоплодів.
20. Спосіб за п. 19, який **відрізняється** тим, що пермеат концентрують шляхом ультрафільтрації, зворотного осмосу та/або концентрування виморожуванням перед висушуванням.
21. Спосіб за будь-яким із пп. 1-20, який **відрізняється** тим, що рівень рН ізоляту білка бульбоплодів доводять до значення вище 2,5, переважно вище 2,75.
22. Спосіб за будь-яким із пп. 1-21, який **відрізняється** тим, що рівень рН ізоляту білка бульбоплодів доводять до значення нижче 3,5, переважно нижче 3,0.
23. Спосіб за будь-яким із пп. 1-22, який **відрізняється** тим, що ізолят білка бульбоплодів потім висушують з одержанням порошку нативного білка бульбоплодів.
24. Спосіб за п. 23, який **відрізняється** тим, що перед висушуванням ізолят білка бульбоплодів піддають додатковій стадії концентрування, переважно шляхом зворотного осмосу, випарювання або концентрування виморожуванням.
25. Спосіб за п. 23 або 24, який **відрізняється** тим, що перед висушуванням рівень рН ізоляту білка бульбоплодів доводять до 5,5-7,0, переважно до 6,0-7,0.
26. Спосіб за будь-яким із пп. 23-25, який **відрізняється** тим, що зазначене висушування здійснюють шляхом висушування виморожуванням або висушування розпиленням.
27. Спосіб за будь-яким із пп. 1-26, який **відрізняється** тим, що діафільтраційний ретентат містить, у процентному співвідношенні від сухої речовини, щонайменше 75 мас. % нативного

білка бульбоплодів, щонайбільше 1,0 мас. % загальної кількості глюкози, фруктози і сахарози, щонайбільше 1 мас. % вільних амінокислот бульбоплодів, щонайбільше 10 мг/кг, переважно щонайбільше 5 мг/кг сульфїту, щонайбільше 200 мг/кг, переважно щонайбільше 100 мг/кг, більше переважно щонайбільше 50 мг/кг, ще більше переважно щонайбільше 25 мг/кг глікоалкалоїдів і/або щонайбільше 5 мг/кг важких металів, які вибрані з групи, що складається з кадмію, ртуті, свинцю та миш'яку.

5

28. Спосіб за будь-яким із пп. 1-27, який відрізняється тим, що спосіб здійснюють з одержанням щонайменше 5 кг білка за годину, переважно щонайменше 25 кг білка за годину.

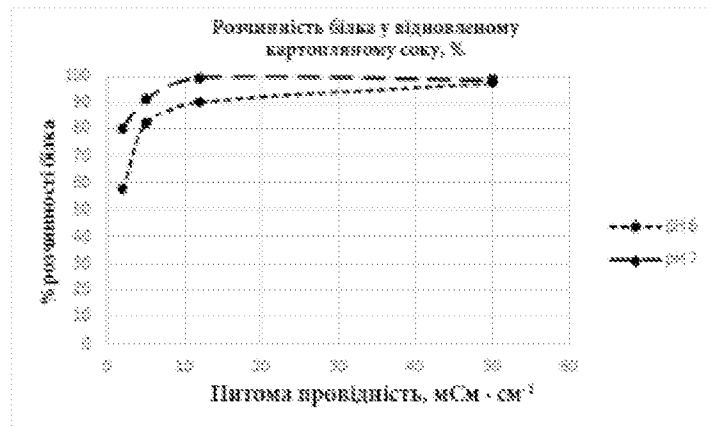
10

29. Ізолят білка бульбоплодів, що містить нативний інгібітор протеази і нативний пататин, одержуваний способом за будь-яким із пп. 1-28, який містить, у процентному співвідношенні від сухої речовини, щонайменше 75 мас. % нативного білка бульбоплодів, щонайбільше 1 мас. % загальної кількості глюкози, фруктози і сахарози, щонайбільше 1 мас. % вільних амінокислот бульбоплодів, щонайбільше 10 мг/кг сульфїту, щонайбільше 200 мг/кг глікоалкалоїдів, щонайбільше 5 мг/кг важких металів, які вибрані з групи, що складається з кадмію, ртуті, свинцю та миш'яку, і щонайбільше 5 % солей металів.

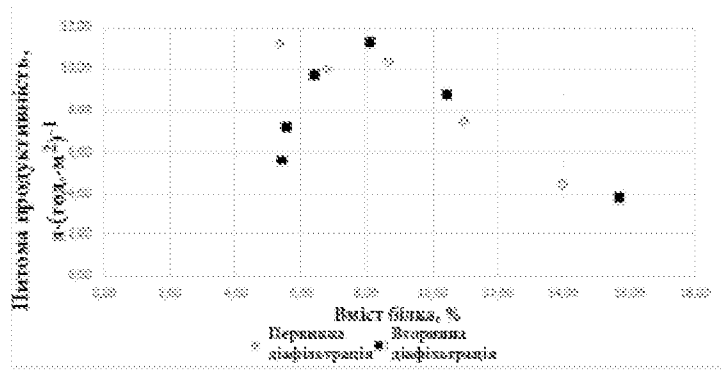
15



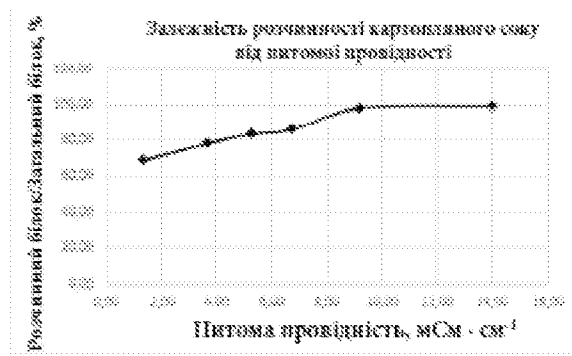
Фіг. 1



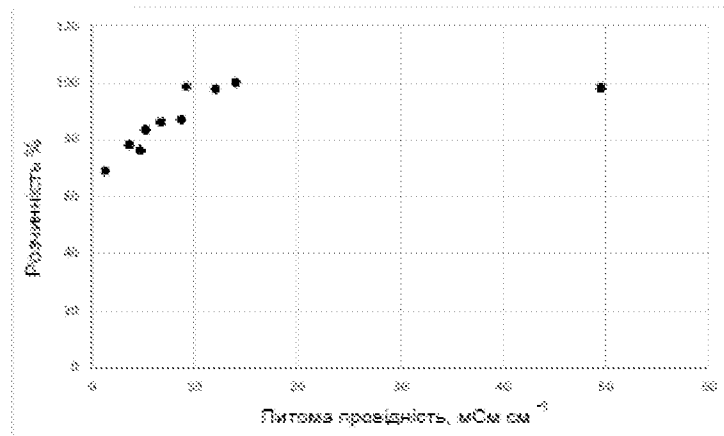
Фіг. 2



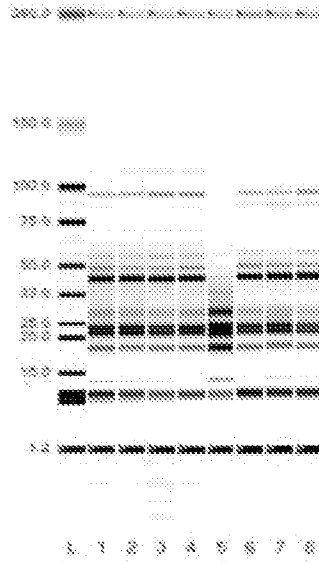
Фіг. 3



Фіг. 4



Фіг. 5



Фиг. 6