



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0413240-8 B1

(22) Data do Depósito: 30/07/2004

(45) Data de Concessão: 02/08/2016



* B R P I 0 4 1 3 2 4 0 B 1 *

(54) Título: PROCESSO PARA PREPARAR UM ISOLADO DE PROTEÍNA DO LINHO

(51) Int.Cl.: C07K 14/415; C07K 1/14

(30) Prioridade Unionista: 01/08/2003 US 60/491.564, 04/11/2003 US 60/516.875

(73) Titular(es): BURCON NUTRASCIENCE (MB) CORP.

(72) Inventor(es): BRENT EVERETT GREEN, RADKA MILANOVA, JAMES LOGIE

PROCESSO PARA PREPARAR UM ISOLADO DE PROTEÍNA DO LINHO**Campo da invenção**

[001] A presente invenção se refere à recuperação de isolados de proteína do linho da farinha de grão oleaginoso do linho.

Referência aos pedidos relacionados

[002] Esse pedido reivindica prioridade correspondente ao 35 USC 119(e) dos pedidos de patente U.S n°s 60/491.564 depositado em 1 de agosto de 2003 e 60/516.875 depositado em 4 de novembro de 2003.

Fundamento da invenção

[003] No pedido de patente n° 10/266.677 depositado em 9 de outubro de 2002 (WO 03/030652), requerido pelo o requerido deste e a revelação a qual é incorporada aqui por referência, é descrito a preparação de um isolado de proteína do linho. Como apresentado neste, é fornecido um isolado de proteína de grão oleaginoso do linho tendo um teor de proteína de pelo menos cerca de 90% em peso, de preferência cerca de 100% em peso, conforme determinado por nitrogênio Kjeldahl x 6,25 (N x 6.25) em uma base em peso seca.

[004] Em tal processo, rendimentos do isolado de proteína do linho eram limitados por causa da incapacidade de concentrar solução de proteína em altos teores de proteína devido à presença de mucilagem solúvel em água. Mucilagem do grão de linho é uma substância pegajosa consistindo substancialmente de polissacarídeos. A presença da mucilagem nos produtos feito de proteína, separada da farinha de grão oleaginoso do linho por outros processos

dificulta produzir produtos com teores de proteína altos suficientes para serem classificados como isolados.

[005] Grão do linho é conhecido por conter cerca de 34 a 37% em peso de proteínas e vários componentes de proteína diferentes, distintos por diferente coeficiente (s) de sedimentação, têm sido identificados. Essas proteínas incluem uma globulina 12S, conhecida como linina, e abulmina 2S, conhecida como colinina.

[006] Grão oleaginoso Linola®, distribuída por Agricore United, é um mutante de grão oleaginoso do linho no qual a composição de ácido graxo tem sido mudada e ácido linolêico (C18:3) tem sido substancialmente reduzido de cerca de 50% em grão oleaginoso do linho convencional a cerca de 2%, através dos procedimentos de cruzamento tradicionais. Essas modificações foram feitas para fornecer, do grão oleaginoso de Linola resultante, um óleo poli-insaturado comestível substancialmente similar ao óleo de girassol em composição de ácido graxo.

Sumário da Invenção

[007] Agora revelou-se que, se uma extração inicial do grão do linho em temperatura elevada usando uma solução brandamente alcalina de bicarbonato de sódio para remover mucilagem é efetuada, então uma concentração muito mais alta de solução de proteína aquosa concentrada pode ser produzida, permitindo rendimentos melhorados de isolado de proteína do linho a serem obtidos. Além disso, um isolado de proteína do linho pode ser produzido de farinha de proteína do linho por precipitação isoelétrica ou por via micelar.

[008] Agora revelou-se que o componente da proteína predominante de isolados de proteína do linho da invenção é uma proteína 7S, a qual aparece ser metade da globulina 12S conhecida como linina, e a qual tem um peso molecular de aproximadamente 162.000 a 169.000 Da, conforme determinado por Tempos de Retenção por HPCL comparados com modelos de proteína animal BioRad. Outros componentes de proteína de isolados de proteína do linho da invenção incluem linina, tendo um peso molecular de aproximadamente 415.000 a 440.000 Da, conforme determinado por Tempos de Retenção por HPLC comparados ao modelo de proteína animal BioRad e colinina, tendo um peso molecular de aproximadamente 16.000 a 17.000 Da, conforme determinado por Tempos de Retenção por HPCL comparados ao modelo de proteína animal BioRad.

[009] Agora ainda se revelou as proporções relativas dos componentes da proteína são similares entre o isolado de proteína do linho derivada de massa micelar de proteína (PMM) e isolado de proteína do linho derivado do sobrenadante da invenção.

[0010] Agora ainda se revelou que isolado de proteína do linho derivado de PMM tendo um teor de proteína de pelo menos cerca de 90% em peso ($N \times 6,25$), de preferência pelo menos cerca de 100% em peso, tem um teor de componente de proteína de cerca de 65 a 95% em peso de proteína do linho 7S (metade da linina), cerca de 0 a 20% em peso de linina e cerca de 0 a 20% em peso de colinina. Tem sido revelado que isolado de proteína do linho derivado de sobrenadante tendo um teor de proteína de pelo menos

cerca de 90% em peso ($N \times 6,25$), de preferência pelo menos cerca de 100% em peso, tem um teor de componente de proteína de cerca de 65 a 95% em peso de proteína do linho 7S (metade de linina), cerca de 0 a 20% em peso de linina e cerca de 0 a 20% em peso de colinina.

[0011] A semelhança nos perfis do componente de proteína com os isolados de proteína do linho derivados de sobrenadante e derivada de PMM resulta em comportamento similar em meios-ambientes onde os isolados de proteína do linho são empregados. Os perfis do teor de proteína similares permitem a combinação de isolados de proteína do linho derivados de sobrenadante e derivados de PMM em qualquer proporção desejada sem alterar a composição, desse modo, resultando em um rendimento aumentado para o processo.

[0012] Isolados de proteína do linho derivados da precipitação isoelétrica (IEP), derivados de sobrenadante e derivados de PMM têm um perfil de aminoácido muito semelhante. Os perfis de aminoácido obtidos são apresentados abaixo nos Exemplos.

[0013] A presente invenção fornece um isolado de proteína do linho tendo um único perfil de proteína e um procedimento para preparação do mesmo envolvendo uma extração inicial do grão oleaginoso. Um isolado de proteína é definido como uma proteína contendo pelo menos cerca de 90% em peso de proteína em uma taxa de conversão de nitrogênio Kjeldahl de $N \times 6,25$. O termo "teor de proteína" conforme usado aqui se refere à quantidade de proteína no isolado de proteína expressa em uma base em peso seca.

[0014] O isolado de proteína do linho produzido de acordo com o processo aqui pode ser usado em aplicações convencionais de isolados de proteína, tais como, fortificação da proteína de comidas processadas, emulsificações de óleos, formadores de corpo em artigos assados e agentes formadores de espuma em produtos os quais capturam gases. Além disso, o isolado de proteína pode ser formado em fibras de proteína, úteis em análogos de farinha, pode ser usado como um substituto da clara ou carga em produto alimentício onde clara é usada como um aglutinante. O isolado de proteína do linho pode ser usado como suplementos nutricionais. Outros usos do isolado de proteína do linho podem ser em comidas para animal doméstico, alimentação de animal e em aplicações industriais e cosméticas e em produtos para cuidado pessoal.

Breve Descrição dos Desenhos

[0015] Figuras 1 e 2 são cromatogramas por HPLC de isolados de Linola, com Figura 1 sendo que para um isolado de proteína de Linola derivado de PMM e Figura 2 sendo que para um isolado de proteína de Linola derivado de sobrenadante; e

[0016] Figuras 3, 4 e 5 são termogramas de Calorímetro Diferencial de Varredura para isolados de Linola, com Figura 3 sendo que para isolado de proteína de Linola derivado de PMM, Figura 4 sendo que para um isolado de proteína de Linola derivado de sobrenadante e Figura 5 sendo que para isolado de proteína de Linola derivado de IEP.

Descrição Geral da Invenção

[0017] A extração inicial do grão de linho é efetuada usando uma solução aquosa, geralmente tendo um pH de cerca de 7,5 a cerca de 9, de preferência no pH natural da solução aquosa do material alcalino, em uma temperatura elevada de cerca de 30° a cerca de 70°C, de preferência em cerca de 50°C. A extração de grão oleaginoso do linho pode ser efetuada em uma relação de grão para solução de cerca de 1:1 a cerca de 1:20, de preferência cerca de 1:5 a cerca de 1:10, usando uma solução aquosa contendo cerca de 0,2 a cerca de 0,7 M de material brandamente alcalino. De preferência, uma solução aquosa de bicarbonato de sódio tendo uma concentração de cerca de 0,5 M é usada a cerca de 50°C em uma relação de grão do linho para solução de cerca de 1:8.

[0018] Após uma primeira extração do grão oleaginoso, geralmente misturando com agitação do grão oleaginoso na solução alcalina aquosa, por cerca de 15 a cerca de 60 minutos, de preferência cerca de 30 a cerca de 60 minutos, a extração é de preferência repetida com solução alcalina aquosa fresca até nenhuma mucilagem ser extraída dos grãos oleaginosos.

[0019] Os grãos oleaginosos extraídos então são processados para recuperar o óleo e para fornecer uma farinha do grão oleaginoso da qual um isolado de proteína do linho pode ser produzido.

[0020] Um procedimento segundo o qual o isolado de proteína do linho pode ser formado da farinha do grão oleaginoso do linho é por precipitação isoelétrica. Antes

de efetuar a remoção inicial de mucilagem conforme fornecido aqui, os requerentes não tinham sido capazes de produzir um isolado de proteína do linho por processamento por precipitação isoelétrica de farinha de grão oleaginoso do linho. Precipitação isoelétrica é comumente usada para preparar outros isolados de proteína, por exemplo, isolado de proteína da soja.

[0021] Em tal precipitação isoelétrica, a farinha de grão oleaginoso do linho, ou farinha de grão oleaginoso de linola, é extraída com uma solução alcalina aquosa, geralmente uma solução de hidróxido de sódio aquosa tendo um pH de cerca de 8 a cerca de 12, de preferência cerca de 9 a cerca de 11, em uma temperatura de cerca de 0° a cerca de 40°C, de preferência cerca de 15°C a cerca de 25°C, em uma concentração de farinha de cerca de 2,5 a cerca de 10% em peso/volume, de preferência cerca de 5% em peso/volume.

[0022] Seguente à extração da farinha, farinha residual é separada da solução de proteína aquosa em qualquer maneira conveniente, tal como empregando filtração a vácuo, seguida pela centrifugação e/ou filtração para remover farinha residual. A farinha residual separada pode ser secada para descartar.

[0023] A solução de proteína do linho é então acidificada para um pH de cerca de 3 a cerca de 5, de preferência cerca de 4, usando qualquer ácido conveniente, tal como ácido clorídrico, para causar a formação de um precipitado de isolado de proteína de linola ou linho. O precipitado é removido de sobrenadante e seco. O isolado de proteína do linho derivado de (IEP) precipitação

isoelétrica seco tem um alto teor de proteína, em excesso de cerca de 90% em peso (N x 6,25), de preferência pelo menos cerca de 100% em peso.

[0024] Alternativamente e de preferência, o isolado de proteína do linho é preparado seguindo o procedimento descrito no pedido de patente U.S nº 10/266.677 co-pendente acima mencionado. O processo pode ser efetuado em uma série de operações em batelada ou como um processo contínuo ou semicontínuo.

[0025] A etapa inicial do processo de produção do isolado de proteína do linho de acordo com o procedimento do pedido acima mencionado envolve solubilizar material proteináceo da farinha do grão oleaginoso do linho. O material proteináceo recuperado da farinha do grão do linho pode ser a proteína de ocorrência natural no grão do linho ou o material proteináceo pode ser uma proteína modificada por manipulação genética, mas possuindo característica hidrofóbica e propriedades polares da proteína natural. A farinha do linho pode ser qualquer farinha do linho resultante da remoção do óleo do linho do grão oleaginoso do linho com vários níveis de proteína não desnaturada, resultando, por exemplo, de métodos de extrusão de óleo a frio ou extração de hexano a quente. A remoção de óleo do linho de grão oleaginoso do linho usualmente é efetuada como uma operação separada do procedimento de recuperação de isolado de proteína descrito aqui.

[0026] Solubilização da proteína é efetuada mais eficazmente usando uma solução de sal já que a presença do sal aumenta a remoção de proteína solúvel da farinha do

grão oleaginoso. O sal usualmente é cloreto de sódio, embora outros sais, tais como cloreto de potássio, possam ser usados. A solução de sal tem uma resistência iônica de pelo menos cerca de 0,10 M, de preferência pelo menos cerca de 0,15 M, geralmente até cerca de 2,0 M para permitir solubilização de quantidades significantes de proteína a serem efetuadas. Como a resistência iônica da solução de sal aumenta, o grau de solubilização de proteína na farinha de grão oleaginoso inicialmente aumenta até um valor máximo ser alcançado. Qualquer aumento subsequente na resistência iônica não aumenta a proteína total solubilizada. A resistência iônica da solução de sal a qual causa solubilização máxima de proteína varia dependendo do sal em questão e a farinha de grão oleaginoso escolhido.

[0027] Em virtude do grau mais alto de diluição exigido para precipitação de proteína com resistências iônicas crescentes, é usualmente preferido utilizar um valor de resistência iônica menor que cerca de 1,0 e mais preferivelmente um valor de cerca de 0,15 a cerca de 0,6.

[0028] Em um processo em batelada, a solubilização do sal da proteína é efetuada em uma temperatura de acima de cerca de 0°C e de preferência até cerca de 35°C, de preferência acompanhada pela agitação para diminuir o tempo de solubilização, o qual é usualmente cerca de 10 a cerca de 90 minutos. É preferido efetuar a solubilização para extrair substancialmente a quantidade máxima de proteína da farinha do grão oleaginoso, de modo a melhorar rendimento do produto. O limite superior da temperatura preferida de cerca de 35°C é escolhido já que o processo se torna não

econômico em níveis de temperatura mais altos em uma forma em batelada.

[0029] Em um processo contínuo, a extração da proteína da farinha de grão oleaginoso do linho é realizada em qualquer maneira consistente efetuando uma extração contínua de proteína da farinha de grão oleaginoso do linho. Em uma modalidade, a farinha de grão oleaginoso do linho é continuamente misturada com uma solução de sal e a mistura é transportada através de um tubo ou conduto tendo um comprimento e em uma vazão para um tempo de residência suficiente para efetuar a extração desejada de acordo com os parâmetros descritos aqui. Em tal procedimento contínuo, a etapa de solubilização de sal é efetuada rapidamente, em um tempo de até cerca de 10 minutos, de preferência para efetuar solubilização para extrair substancialmente a quantidade máxima de proteína da farinha de grão oleaginoso do linho. A solubilização no procedimento contínuo de preferência é efetuada em temperaturas elevadas, geralmente até cerca de 60°C ou mais.

[0030] A solução de sal aquosa e a farinha de grão oleaginoso do linho têm um pH natural de cerca de 5 a cerca de 7 para permitir um isolado de proteína ser formado por via micelar, conforme descrito em mais detalhe abaixo. O valor de pH ótimo para rendimento máximo de isolado de proteína de linola ou linho varia dependendo da farinha de grão oleaginoso do linho escolhido.

[0031] Nos e próximo aos limites da faixa de pH, formação de isolado de proteína somente ocorre parcialmente através da via de micélio e em rendimentos mais baixos do

que obteníveis em qualquer lugar na faixa de pH. Por essas razões, valores de pH de cerca de 5,3 a cerca de 6,2 são preferidos.

[0032] O pH da solução de sal pode ser ajustado para qualquer valor desejado dentro da faixa de cerca de 4 a cerca de 7 para uso na etapa de extração pelo uso de qualquer ácido conveniente, usualmente ácido clorídrico, ou alcalino, usualmente hidróxido de sódio, conforme exigido.

[0033] A concentração de farinha de grão oleaginoso na solução de sal durante a etapa de solubilização pode variar amplamente. Valores de concentração típicos são cerca de 5 a cerca de 15% em peso/volume.

[0034] A etapa de extração de proteína com a solução de sal aquosa tem um efeito adicional de solubilizar gorduras as quais podem estar presentes na farinha de grão oleaginoso, a qual então resulta nas gorduras estando presentes na fase aquosa.

[0035] A solução de proteína resultante da etapa de extração geralmente tem uma concentração de proteína de cerca de 5 a cerca de 40 g/l, de preferência cerca de 10 a cerca de 30 g/l.

[0036] A fase aquosa resultante da etapa de extração então pode ser separada da farinha de grão oleaginoso do linho residual, em qualquer maneira conveniente, tal como empregando filtração a vácuo, seguida pela centrifugação e/ou filtração para remover farinha residual. A farinha residual separada pode ser secada para descartar.

[0037] Onde a farinha de grão oleaginoso do linho

contém quantidades significantes de gordura, então as etapas de desengorduramento descritas nas patentes U.S n°s 5,844,086 e 6.005.076, requerida pelo o requerente deste e as revelações as quais são incorporadas aqui por referência, para canola, podem ser efetuadas na solução de proteína aquosa separada e na solução de proteína aquosa concentrada discutida abaixo.

[0038] Como uma alternativa para extrair farinha de grão oleaginoso com uma solução de sal aquosa, tal extração pode ser feita usando água somente, embora a utilização de água somente tende a extrair menos proteína da farinha de grão oleaginoso do linho do que a solução de sal aquosa. Onde tal alternativa é empregada, então o sal, nas concentrações discutidas acima, pode ser adicionado para a solução de proteína após separação da farinha de grão oleaginoso do linho residual de modo a manter a proteína na solução durante a etapa de concentração descrita abaixo.

[0039] A solução de proteína aquosa então é concentrada para aumentar sua concentração de proteína enquanto mantém a sua resistência iônica substancialmente constante. Tal concentração geralmente é efetuada para fornecer uma solução de proteína concentrada tendo uma concentração de proteína de pelo menos cerca de 150 g/l, de preferência pelo menos cerca de 250 g/l.

[0040] A etapa de concentração pode ser efetuada em qualquer maneira conveniente consistente com operação em batelada ou contínua, tal como empregando qualquer técnica em membrana seletiva conveniente, tal como ultrafiltração ou diafiltração, usando membranas, tais como membranas de

fibra oca ou membranas espirais-enroladas, com um corte de peso molecular adequado, tal como cerca de 3.000 a cerca de 100.000 daltons, de preferência cerca de 5,000 a cerca de 10.000 daltons, com relação às configurações e materiais de membrana diferentes e, para operação contínua, dimensionadas para permitir o grau desejado de concentração conforme a solução de proteína aquosa passa através das membranas.

[0041] A solução de proteína concentrada então pode ser submetida a uma etapa de diafiltração usando uma solução de sal aquosa, usualmente uma solução de cloreto de sódio, da mesma molaridade e pH como a solução de extração. Tal diafiltração pode ser efetuada usando de cerca de 2 a cerca de 20 volumes de solução de diafiltração, de preferência cerca de 5 a cerca de 10 volumes de solução de diafiltração. Na operação de diafiltração, outras quantidades de contaminação são removidas da solução de proteína aquosa pela passagem através da membrana com o permeado. A operação de diafiltração pode ser efetuada até nenhuma quantidade significativa de contaminantes esteja presente no permeado. Tal diafiltração pode ser efetuada usando uma membrana tendo um corte de peso molecular na faixa de cerca de 3.000 a cerca de 100.00 daltons, de preferência cerca de 5.000 a cerca de 10.000 daltons, com relação à configuração e materiais da membrana diferentes.

[0042] Um antioxidante pode estar presente no meio de diafiltração durante pelo menos parte da etapa de diafiltração. O antioxidante pode ser qualquer antioxidante conveniente, tal como sulfito de sódio ou ácido ascórbico.

A quantidade de antioxidante empregada no meio de diafiltração depende dos materiais empregados e pode variar de cerca de 0,01 a cerca de 1% em peso, de preferência cerca de 0,05% em peso.

[0043] A etapa de concentração e a etapa de diafiltração opcional podem ser efetuadas em qualquer temperatura conveniente, geralmente cerca de 15° a cerca de 60°C, e por um período de tempo para efetuar o grau desejado de concentração. A temperatura e outras condições usadas, para algum grau, dependem do equipamento da membrana usado para efetuar a concentração e a concentração de proteína desejada da solução.

[0044] Como é bem conhecida, ultrafiltração e técnicas de membrana seletiva semelhantes permitem espécies de baixo peso molecular passarem através da mesma enquanto evitam espécies de peso molecular mais alto de fazer o mesmo. As espécies de baixo peso molecular incluem não somente as espécies iônicas do sal alimentar, mas também materiais de baixo peso molecular extraídos do material fonte, tal como, carboidratos, pigmentos e fatores anti-nutricionais, assim como quaisquer formas de baixo peso molecular da proteína. O corte de baixo peso molecular da membrana é usualmente escolhido para assegurar retenção de uma proporção significativa da proteína na solução, enquanto permite contaminantes passarem através, com relação às configurações e materiais de membrana diferentes.

[0045] A solução de proteína concentrada e opcionalmente diafiltrada pode ser submetida à pasteurização para matar qualquer bactéria a qual pode

estar presente na farinha original como consequência de armazenamento ou de outra forma e extraída da farinha na solução de isolado de proteína do linho na etapa de extração. Tal pasteurização pode ser efetuada sob quaisquer condições de pasteurização desejadas. Geralmente, a solução de proteína concentrada e opcionalmente diafiltrada é aquecida para uma temperatura de cerca de 55° a cerca de 70°C, de preferência cerca de 60°C a cerca de 65°C, por cerca de 10 a cerca de 15 minutos, de preferência cerca de 10 minutos. A solução de proteína concentrada pasteurizada então pode ser resfriada para outro processamento conforme descrito abaixo, de preferência para uma temperatura de cerca de 25° a cerca de 40°C.

[0046] Dependendo da temperatura empregada na etapa de concentração, a solução de proteína concentrada pode ser aquecida para uma temperatura de pelo menos 20°, e até cerca de 60°C, de preferência cerca de 25°C a cerca de 40°C, para diminuir a viscosidade da solução de proteína concentrada para facilitar desempenho da etapa de diluição subsequente e formação de micélio. A solução de proteína concentrada não deveria ser aquecida além de uma temperatura acima da qual a temperatura da solução de proteína concentrada não permita formação de micélio em diluição por água resfriada. A solução de proteína concentrada pode ser submetida a uma outra operação de desengorduração, se exigido, conforme descrito nas patentes U.S n°s 5.844.086 e 6.005.076.

[0047] A solução de proteína concentrada resultante da etapa de concentração e etapa de desengorduração

opcional então é diluída para efetuar formação de micélio misturando a solução de proteína concentrada com água resfriada tendo o volume exigido para alcançar o grau de diluição desejado. A solução de proteína concentrada é diluída por cerca de 15 vezes ou menos, de preferência cerca de 10 vezes ou menos.

[0048] A água resfriada com a qual a solução de proteína concentrada é misturada tem uma temperatura de menos que cerca de 15°C, geralmente cerca de 3° a cerca de 15°C, de preferência menos que cerca de 10°C, já que rendimentos melhorados de isolado de proteína na forma de massa micelar de proteína são obtidos com essas temperaturas mais frias nos fatores de diluição usados.

[0049] Em uma operação em batelada, a batelada de solução de proteína concentrada é adicionada a um corpo estático de água resfriada tendo o volume desejado, conforme discutido acima. A diluição da solução de proteína concentrada e conseqüente diminuição em resistência iônica causa a formação de uma massa tipo nuvem de moléculas de proteína altamente associadas na forma de gotículas de proteína separadas na forma micelar. No procedimento em batelada, os micélios de proteína são deixados precipitarem no corpo da água resfriada para formar uma massa (PMM) micelar de proteína tipo glúten pegajosa, amorfa, densa, coalescente, agregada. O assentamento pode ser ajudado, tal como por centrifugação. Tal assentamento induzido diminui o teor líquido da massa micelar de proteína, pode meio disso diminuindo o teor de umidade geralmente de cerca de 70% em peso a cerca de 95% em peso para um valor de geralmente

cerca de 50% em peso a cerca de 80% em peso da massa micelar total. Diminuindo o teor de umidade da massa micelar nessa forma também diminui o teor de sal oculto da massa micelar, e então o teor de sal de isolado seco.

[0050] Alternativamente, a operação de diluição pode ser realizada continuamente passando continuamente a solução de proteína concentrada para uma entrada de um tubo em forma de T, enquanto a água de diluição é alimentada para a outra entrada do tubo em forma de T, deixando misturar no tubo. A água de diluição é alimentada no tubo em forma de T a uma taxa suficiente para alcançar o grau desejado de diluição da solução de proteína concentrada.

[0051] A mistura da solução de proteína concentrada e a água de diluição no tubo iniciam a formação de micélios de proteína e a mistura é continuamente alimentada da saída do tubo em forma de T em um vaso de precipitação, do qual, quando completo, sobrenadante é permitido descarregar. A mistura de preferência é alimentada no corpo de líquido no vaso de precipitação em uma maneira a qual minimiza turbulência dentro do corpo do líquido.

[0052] No procedimento contínuo, os micélios de proteína são deixados precipitarem no vaso de precipitação para formar uma massa (PMM) micelar de proteína do tipo glúten, pegajosa, amorfa, densa, coalescente, agregada, e o procedimento contínuo até uma quantidade desejada da PMM ter acumulado no fundo do vaso de assentamento, conseqüentemente a PMM acumulada é removida do vaso de precipitação.

[0053] O isolado assentado é separado da fase

aquosa residual ou sobrenadante, tal como por decantação da fase aquosa residual da massa assentada ou por centrifugação. A PMM pode ser usada na forma úmida ou pode ser seca, por qualquer técnica conveniente, tal como secagem por pulverização, secagem a frio ou secagem por tambor a vácuo para uma forma seca. O isolado de proteína do linho seco tem um alto teor de proteína, em excesso de cerca de 90% em peso de proteína, de preferência pelo menos cerca de 100% em peso ($N \times 6,25$) e é substancialmente não desnaturado (conforme determinado pelo calorímetro diferencial de varredura). O isolado de proteína do linho seco isolado da farinha de grão oleaginoso graxa pode também ter um teor de gordura residual baixo, quando os procedimentos de USPs 5.844.086 e 6.005.076 são empregados, os quais podem ser abaixo de cerca de 1% em peso.

[0054] O sobrenadante da etapa de formação de PMM e assentamento contém quantidades significantes de proteína do linho, não precipitada na etapa de diluição, e o sobrenadante pode ser processado para recuperar quantidades adicionais de proteína através do mesmo.

[0055] Em tal procedimento, o sobrenadante da etapa de diluição, seguindo a remoção da PMM, pode ser concentrado para aumentar a sua concentração de proteína. Tal concentração é efetuada usando qualquer técnica de membrana seletiva conveniente, tal como ultrafiltração, usando membranas com um corte de peso molecular adequado permitindo espécies de baixo peso molecular, incluindo o sal alimentar e outros materiais de baixo peso molecular não proteináceos extraídos do material fonte, para passar

através da membrana, enquanto retém proteína do linho na solução. Membranas de ultrafiltração tendo corte de peso molecular de cerca de 3.000 a 100.000 daltons considerando configurações e membranas diferentes, podem ser usadas. Concentração do sobrenadante nessa forma também reduz o volume de líquido exigido a ser secado para recuperar a proteína, e então a energia exigida para secagem. O sobrenadante geralmente é concentrado a um teor de proteína de cerca de 50 a 300 g/l, de preferência cerca de 100 a cerca de 200 g/l, antes da secagem.

[0056] O sobrenadante concentrado pode ser secado por qualquer técnica conveniente, tal como secagem por pulverização, secagem a frio ou secagem por tambor a vácuo, para uma forma seca para fornecer ainda um isolado de proteína do linho. Tal isolado de proteína do linho tem um teor de proteína alto, usualmente em excesso de cerca de 90% em peso de proteína (N x6.25), de preferência pelo menos 100% em peso, e é substancialmente desnaturado (conforme determinado por calorímetro diferencial de varredura). Se desejada, a PMM úmida pode ser combinada com o sobrenadante concentrado antes de secar as correntes de proteína combinadas por qualquer técnica conveniente para fornecer um isolado de proteína do linho. O isolado de proteína do linho combinado tem um alto teor de proteína, em excesso de cerca de 90% em peso de proteína (N x 6.25), de preferência pelo menos 100% em peso, e é substancialmente desnaturado (conforme determinado por calorímetro diferencial de varredura).

[0057] Em um procedimento alternativo, uma parte

somente do sobrenadante concentrado pode ser misturada com pelo menos parte da PPM e a mistura resultante secada. O remanescente do sobrenadante concentrado pode ser secado conforme qualquer do remanescente da PPM. Ainda, PMM seca e sobrenadante seco também podem ser misturados a seco em quaisquer proporções relativas desejadas.

[0058] Operando nessa maneira, um número de isolados de proteína do linho pode ser recuperado, na forma de PMM seca, sobrenadante seco e misturas secas de várias proporções em peso de PMM e sobrenadante, geralmente de cerca de 5:95 a cerca de 95:5 em peso, o qual pode ser desejável para se obter propriedades nutricionais e funcionais diferentes.

[0059] Alternativamente, o procedimento descrito no pedido de patente americano co-pendente nº 60/544.346 depositado em 17 de fevereiro de 2004, requerido pelo requerente deste e a revelação a qual é incorporada aqui por referência, para a recuperação de isolado de proteína de canola, pode ser usado para recuperar o isolado de proteína do linho. De acordo com o procedimento descrito neste, a solução de proteína concentrada resultante da etapa de concentração de solução de proteína é seca diretamente, em vez de processar para produzir PMM e separadamente processar o sobrenadante. Secagem da solução de proteína concentrada, a qual pode também ser opcionalmente diafiltrada e desengordurada, conforme descrito acima, pode ser efetuada em qualquer maneira conveniente, tal como secagem por pulverização, secagem a frio ou secagem por tambor a vácuo.

[0060] Desde que os isolados de proteína sejam formados pelo o procedimento de secagem direta sejam geralmente de menor pureza, em particular, um teor de sal mais alto, do que obtidos pelo procedimento descrito acima, eles são de preferência usados em aplicações não humanas, embora os isolados de proteína possam ser processados para reduzirem seus teores de sal por qualquer procedimento conveniente, tal como por diálise.

[0061] As quantidades relativas das respectivas proteínas em qualquer isolado de proteína dado podem ser determinadas por qualquer técnica analítica conveniente, tal como uma técnica de separação analítica. A mais comum dessas técnicas usa meio seletivo em uma coluna que permite separação baseada no tamanho. Para aplicações em cromatografia de permeação em gel (GPC), materiais tipo gel esféricos são usados. Onde pressão é usada, como em cromatografia de líquido de alta pressão (HPCL), então um meio rígido é usado. A segunda técnica também é conhecida como cromatografia de exclusão por tamanho (SEC). Os resultados obtidos usando tais técnicas em amostras de isolado de proteína do linho preparadas conforme descritas aqui estão contidas nos Exemplos abaixo.

[0062] O isolado de proteína do linho derivado de PMM e o isolado de proteína do linho derivado do sobrenadante predominantemente consistem da proteína do linho 7S (metade de linina) tendo um peso molecular de aproximadamente 162.000 a 169.000 Da, com quantidades menores de linina, tendo um peso molecular de aproximadamente 415.000 a 440.000 Da e colinina, tendo um

peso molecular de aproximadamente 16.000 a 17.000 Da. Em geral, a proteína derivada de PMM contém:

Cerca de 65 a 95% em peso de proteína do linho 7S (metade de linina);

Cerca de 0 a 20% em peso de linina; e

Cerca de 0 a 20% em peso de colinina.

Em geral, a proteína derivada do sobrenadante contém:

Cerca de 65 a 95% em peso de proteína do linho 7S (metade de linina);

Cerca de 0 a 20% em peso de linina; e

Cerca de 0 a 20% em peso de colinina.

Exemplos

[0063] Esse exemplo ilustra a remoção de mucilagem de farinha de grão oleaginoso de Linola.

[0064] Grão oleaginoso de Linola foi lavado usando níveis de concentração variados de bicarbonato de sódio misturando bicarbonato aquoso com uma relação de grão:solvente de 1:8 com grão oleaginoso de Linola por uma hora a 50°C usando um misturador superior ajustado em alta velocidade.

[0065] Lavagens foram feitas em cada concentração de solução de bicarbonato de sódio aquoso testadas de modo a comparar a quantidade de mucilagem recuperada dos grãos. Um total de 500 g de linola foi lavado em 4 l de bicarbonato de sódio em cada concentração.

[0066] O sobrenadante de cada lavagem foi decantado e 100 ml de cada sobrenadante foi diluído 1:1 com 88% de etanol para precipitar qualquer mucilagem solubilizada. A mucilagem então foi coletada e seca para calcular a

quantidade total de mucilagem removida dos grãos.

[0067] As quantidades extraídas nas várias concentrações de solução de bicarbonato de sódio são mostradas na Tabela I:

Tabela I

Peso de mucilagem removida durante primeira lavagem em cada concentração

Concentração de bicarbonato de sódio	Peso de Mucilagem (g)
0,1 M	16,0 g
0,3 M	16,4 g
0,5 M	32,0 g

[0068] Como pode ser visto da Tabela I, uma concentração de bicarbonato de sódio de 0,5 M é muito mais eficaz para remover mucilagem do que menores concentrações. Além disso, na concentração de 0,5 M, o grão ainda tinha a sensação pegajosa que é atribuído para mucilagem. Uma segunda lavagem idêntica foi feita e outras 34 gramas de mucilagem foram removidas. Seguindo essa segunda lavagem, uma terceira lavagem foi feita e outras 36,4 gramas de mucilagem foram removidas. Uma quarta lavagem rendeu muito pouca mucilagem, indicando remoção completa de mucilagem das 500 gramas de grão de linola. Um total de 102,8 gramas de mucilagem foi removido.

[0069] Seguindo essas lavagens, o grão não teve a sensação "pegajosa" que mucilagem confere, fornecendo outra boa indicação que maioria da mucilagem tinha sido removida.

Exemplo 2:

[0070] Esse exemplo ilustra a preparação de uma farinha de linho de acordo com uma modalidade da invenção.

[0071] 25 kg de grão oleaginoso de Linola, variedade 2047, foi adicionada a 200 l de 0,5 M de bicarbonato de sódio a 50°C em um tanque de mistura de 400 ml. A suspensão foi agitada vigorosamente por uma hora. Após assentamento, a fase aquosa foi decantada e o resto foi descartado. Uma parte de um litro da fase aquosa decantada foi diluída com um volume igual de etanol, para precipitar mucilagem para fornecer uma estimativa aproximada da quantidade de mucilagem recuperada.

[0072] Após decantar a fase aquosa, o grão foi enxaguado duas vezes com água de torneira quente para remover qualquer solução de lavagem residual. O procedimento de extração, separação e lavagem de bicarbonato de sódio foi repetido cinco vezes. O grão foi então lavado quatro vezes com água de torneira quente para remover qualquer lavagem residual e mucilagem. O grão foi revelado ter perdido sua característica de sensação pegajosa, fornecendo uma boa indicação que a mucilagem tinha sido removida.

[0073] Revelou-se que cada lavagem com bicarbonato de sódio aquoso sucessiva removeu menos mucilagem do que a última e que, pela quinta lavagem, muito pouco de mucilagem foi precipitada de uma parte de um litro de solução de lavagem quando diluída com etanol, fornecendo uma boa indicação que a maioria da mucilagem tinha sido removida do grão.

[0074] O grão então foi seco, lavado e

desengordurado para remover o óleo do grão.

Exemplo 3:

[0075] Esse exemplo ilustra a preparação de um isolado de proteína da Linola da farinha com mucilagem reduzida por precipitação isoelétrica.

[0076] 10 kg de farinha de grão oleaginoso de Linola desengordurada, preparada conforme descrito no Exemplo 2, foi adicionada a 200 l de 0,15 M de solução de NaCl em temperatura ambiente e o pH da mistura foi ajustado para 11,0 com 50% em peso de solução de hidróxido de sódio. A suspensão foi agitada por uma hora, após quando a farinha extraída foi deixada precipitar da solução de proteína resultante por uma hora.

[0077] 100 l de solução de proteína, tendo um teor de proteína de 13 g/l, foi então decantada e filtrada através de 20 e filtros de 0,2 µm em um filtro prensa de modo a clarear a solução. A solução clareada então foi colocada em um resfriador a 4°C por 16 horas para deixar qualquer óleo presente elevar-se para superfície, onde ela poderia ser retirada. Muito pouco óleo foi visto, indicando uma etapa desengordurante muito eficaz.

[0078] O pH da solução de proteína em temperatura ambiente foi então ajustado para 4,0 usando 3 N de HCl e a proteína imediatamente começou a precipitar por uma mudança de cor da solução de uma cor amarelo ouro para branco leitoso. Uma vez a mistura ter sido parada, a proteína precipitou rapidamente da solução. Após um período de assentamento de duas horas, o sobrenadante foi decantado e analisado pelo teor de proteína.

[0079] Seguindo remoção de sobrenadante, 10 l de material em pelota foi centrifugado a 10.000 xg por 5 minutos para diminuir o teor de sobrenadante residual da proteína precipitada. A pelota resultante foi reconstituída em 4 l de água e seca por pulverização para fornecer 293 g de isolado de proteína de Linola derivada de IEP seco. O teor de proteína da proteína seca por pulverização foi 101% em peso (N x 6,25) d.b

Exemplo 4:

[0080] Esse exemplo ilustra as propriedades funcionais do isolado de proteína de Linola produzido no Exemplo 3.

[0081] O isolado de proteína de Linola derivado de IEP produzido de acordo com o procedimento de Exemplo 3 (Linola IEP) foi testado pelas propriedades funcionais de formação de espuma e capacidade de manutenção do óleo em comparação com amostras típicas de isolados de proteína de canola derivada de sobrenadante (CPI) e derivada de PMM produzidos de acordo com o processo descrito no pedido de patente americano pendente nº 10/137.391, depositado em 3 de maio de 2002 (WO 02/089597), requerido pelo o requerente deste e a revelação a qual é incorporada aqui por referência.

[0082] Os procedimentos testes empregados são aqueles apresentados no pedido de patente americano co-pendente nº 10/137.306 depositado em 3 de maio de 2002 (WO 02/089597), requerido pelo requerente deste e a revelação a qual é incorporada aqui por referência.

[0083] Para formação de espuma, o procedimento

utilizado é que descrito em Phillips et al, J. Food Sci, 55:1441, 1990, 3,75 g de amostras de isolados de proteína foram colocadas em béqueres individuais de 150 ml. 60 ml de 0,075 M de solução de NaCl foram adicionados à proteína, inicialmente produzindo uma pasta para dissolver a proteína com um pouco ml de líquido. A mistura foi misturada em um agitador com uma barra de agitação magnética por 10 minutos. O pH da solução foi ajustado para 7,00 com 0,1 M de NaOH, e a solução agitada por outros 10 minutos. O pH foi reajustado para 7,00 e o volume de líquido foi levado a 75 ml com a quantidade exigida de 0,075 M de NaCl para render uma solução de proteína de 5% em peso/volume. Os 75 ml de solução foram vertidos em um recipiente de mistura Hobart e o peso de solução combinado, recipiente e ligação por impulso foi registrado. A solução de proteína foi batida em velocidade de 3 a 5 minutos.

[0084] Espuma suficiente foi gentilmente retirada com concha para encher dois copos de medição de 125 ml de tara usando uma espátula de borracha. Excesso de espuma foi descartado usando uma extremidade plana de uma faca grande para nivelar o topo da espuma mesmo com o topo do copo de medição e o peso da espuma foi registrado. A espuma gentilmente retornou para o recipiente de mistura e bateu por outros 5 minutos. Esse procedimento então foi repetido. A espuma foi gentilmente retornada para o recipiente de mistura e bateu por uns outros 5 minutos para 15 minutos no total. O procedimento de novo foi repetido.

[0085] O excesso foi calculado da seguinte equação:
$$\% \text{ de excesso} = (125 \text{ ml de proteína em peso}) - (125 \text{ ml de espuma em}$$

peso) x 100

(125 ml de espuma em peso)

[0086] A estabilidade da espuma foi também testada. A solução de proteína foi preparada na mesma maneira conforme descrito nas medições do excesso em %, exceto a solução de proteína ser batida por 15 minutos em nível 3. Usando uma espátula de borracha, a espuma foi cuidadosamente transferida em um funil de pescoço longo de 1 l colocado no topo de um cilindro graduado de 250 ml. Uma pequena quantidade de lã de vidro foi colocada no topo do bocal do funil para evitar espuma de drenar enquanto ainda permite drenagem do líquido.

[0087] O volume do líquido que foi coletado no cilindro graduado a 5, 10 e 15 minutos foi medido. O volume mantido na lã foi adicionado para o volume final.

[0088] Para a capacidade de manutenção de óleo, o procedimento usado nesse exemplo é aquele descrito em Swift et al, Food Technol, 15, 436-72 (1961).

[0089] A receita mostrada na Tabela II foi usada para preparar uma emulsão:

Ingrediente	Peso Adicionado (g)
Isolado de Proteína	0,5
Vinagre (5% de ácido acético Sem nome)	55,2
Óleo de canola (CPS Foods)	N/D
Açúcar (Rogers fino granulado)	4,1
Sal (Sifto)	1,2

Água destilada	52,4
----------------	------

[0090] O açúcar, sal e isolado de proteína foram combinados a seco em um béquer de 600 ml. A água e vinagre foram misturados, inicialmente produzindo uma pasta para dissolver a proteína com pouco ml de líquido. A mistura foi misturada em um agitador usando uma barra magnética por 5 minutos. Um béquer de 2000 ml foi enchido com óleo de canola e o peso registrado. Uma mangueira de sucção foi colocada no óleo.

[0091] A extremidade de distribuição da mangueira foi ligada a um homogeneizador e a bomba foi iniciada com óleo usando regulação #1 para dispensar aproximadamente 40 a 50 ml/min. Ao mesmo tempo, o homogeneizador (Silverston LHRT) foi girado para 5.000 rpm e a bomba ligada para dispersar o óleo. O ponto o qual a emulsão era mais viscosa era visualmente observada. Ao ponto de inversão, a bomba e homogeneizador foram imediatamente desligados. Na extremidade da mangueira sucção foi comprimido com um prendedor para manter o óleo nela e o peso do óleo deixado no béquer de 200 ml foi determinado.

[0092] Os resultados obtidos são mostrados nas Tabelas II e IV abaixo:

Tabela III

Isolado de proteína de Linola derivado de IEP vs CPI
derivado de PMM de canola

Batelada	% de excesso (volume	Estabilidade da espuma (ml de drenagem	Capacidade de Manutenção do óleo (óleo em	Tamanho Globular (µm)
----------	----------------------------	--	---	-----------------------------

	de espuma)	em 15 minutos)	ml/100 mg de proteína)	
CPI-1	1471,8	17,5	174,7	18,9
CPI-2	1030,4	32,7	190,5	29,1
CPI-3	1216,5	24,0	119,8	24,3
CPI-4	1051,2	45,3	115,4	21,6
CPI-5	1091,6	35,3	124,5	28,0
CPI-6	1196,1	34,0	166,9	24,6
Linola derivada de IEP	1770,9	0,67	118,9	59,0

Tabela IV

Isolado de proteína de Linola derivado de IEP vs CPI
derivado de sobrenadante de canola

Batelada	% de excesso (volume de espuma)	Estabilidade da espuma (ml de drenagem em 15 minutos)	Capacidade de Manutenção do óleo (óleo em ml/100 mg de proteína)	Tamanho Globular (μ m)
CPI-7	2603,6	22,7	67,2	72,6
CPI-8	1984,8	21,3	53,6	151,7
CPI-9	1924,4	22,0	43,3	151,7
CPI-10	1889,2	17,3	41,3	192,4
Linola derivada de IEP	1170,9	0,67	118,9	59,0

[0093] Como pode ser visto da Tabela II, o isolado de proteína de Linola de IEP tinha propriedades de espuma superiores aos isolados de proteína de canola derivados de PMM, com volume de espuma mais alto e menos drenagem (melhor estabilidade). A capacidade manutenção de óleo do

isolado de proteína de Linola de IEP foi comparável com o isolado de proteína de canola derivado de PMM, mas ele tinha um tamanho globular maior.

[0094] Como pode ser visto da Tabela IV, o volume de espuma produzido do isolado de proteína de Linola de IEP era menor que aquele produzido pelo isolado de proteína de canola derivado de sobrenadante, mas a espuma era muito mais estável. O isolado de proteína de Linola tinha propriedades de emulsificação superiores ao isolado de proteína de canola derivado de sobrenadante. A capacidade de manutenção de óleo do isolado de proteína do Linola era aproximadamente duas vezes tão alto quanto o isolado de proteína de canola derivada de sobrenadante e tinha um tamanho globular menor.

Exemplo 5:

[0095] Esse exemplo ilustra a preparação de um isolado de proteína de farinha com mucilagem reduzida por uma via micelar.

[0096] 4 kg da farinha de grão oleaginoso de Linola desengordurada, preparada conforme descrito no exemplo 2, foi adicionada a 80 l de 0,5 M de solução de NaCl em temperatura ambiente (5% em peso/volume). A suspensão foi misturada por uma hora, seguindo a qual a suspensão foi deixada precipitar por ½ hora e a solução de proteína aquosa decantou. A solução de proteína aquosa decantada tinha um teor de proteína de 7,1 g/l e um volume de 55 l. A solução foi filtrada através de 20 µM de elementos filtrantes em um filtro prensa para remover sólidos suspensos. A prensa foi carregada com 20 ml de água para

fornecer 75 l de um filtrado tendo um teor de proteína de 5,28 g/l.

[0097] O filtrado foi submetido a ultrafiltração usando membranas de ultrafiltração de corte de peso molecular de 300 daltons para concentrar a solução de 1,3 l de solução de proteína aquosa concentrada (retentado) tendo um teor de proteína de 174 g/l. O retentado então foi diluído em 9 volumes de água a 4°C, que produziu uma nuvem branca de micélios de proteína.

[0098] Um período de assentamento de 16 horas foi permitido após o qual o sobrenadante foi decantado e centrifugado para recuperar o material precipitado tanto quanto possível para fornecer 11 l de sobrenadante tendo um teor de proteína de 1,11 g/l. A pelota do isolado de proteína de Linola obtida da etapa de precipitação também foi centrifugada para reduzir seu volume a um nível mínimo.

[0099] A pelota do isolado de proteína de linola foi secada para produzir 81 g de proteína seca, representando um rendimento de 20% em peso de proteína extraída da farinha do grão de Linola. O isolado de proteína de Linola seco tinha um teor de proteína de 112% em peso (N x 6,25) d.b.

[00100] O sobrenadante clareado foi concentrado usando membranas de corte de 300 daltons de peso molecular para 1,25 l de sobrenadante concentrado contendo 63,3 g/l de proteína. O sobrenadante concentrado foi seco e produziu 77 g de um isolado de proteína de Linola (rendimento de 20%) tendo um teor de proteína de 106% em peso (N x 6,25) d.b.

[00101] Análise por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) foi realizada conforme descrito no pedido de patente americano co-pendente nº 10/413.371 depositado em 15 de abril de 2003 (WO 03/088760), requerido pelo requerente deste e a revelação a qual é incorporada aqui por referência, nas duas frações de linola.

Exemplo 6:

[00102] Esse exemplo ilustra as propriedades funcionais dos isolados de proteína de Linola derivados de sobrenadante e derivados de PMM produzidos no Exemplo 5.

[00103] Os isolados de proteína de Linola derivados de sobrenadante e derivados de PMM preparados de acordo com os procedimentos do Exemplo 5 foram testados pelas propriedades funcionais de formação de espuma e capacidade de manutenção do óleo, de acordo com os procedimentos descritos no exemplo 4, em comparação com os isolados de proteína de Linola (CPI) derivados de sobrenadante e derivados de PMM típicos produzidos de acordo com o processo descrito no pedido de patente americano acima mencionado de nº 10/137.391 (WO 02/989597).

[00104] Os resultados obtidos são apresentados nas seguintes Tabelas V e VI.

Tabela V

Isolado de Proteína de Linola vs CPI derivado de PMM de
Canola

Batelada	% de excesso (volume de espuma)	Estabilidade da espuma (drenagem em ml em 15	Capacidade de Manutenção do óleo (óleo em ml/100 mg de	Tamanho Globular (µm)
----------	---------------------------------------	---	---	-----------------------------

		minutos)	proteína)	
CPI-1	1471,8	17,5	174,7	18,9
CPI-2	1030,4	32,7	190,5	29,1
CPI-3	1216,5	24,0	119,8	24,3
CPI-4	1051,2	45,3	115,4	21,6
CPI-5	1091,6	35,3	124,5	28,0
CPI-6	1196,1	34,0	166,9	24,6
Linola derivada de PMM	1464,0	2,0	139,5	19,8
Linola derivada de sobrenadant e	1470,0	0	81,4	11,8

Tabela VI

Isolado de Proteína de Linola vs CPI derivado de
sobrenadante de Canola

Batelada	% de excesso (volume de espuma)	Estabilidade da espuma (drenagem em ml em 15 minutos)	Capacidade de Manutenção do óleo (óleo em ml/100 mg de proteína)	Tamanho Globular (µm)
CPI-7	2603,6	22,7	67,2	72,6
CPI-8	1984,8	21,3	53,6	151,7
CPI-9	1924,4	22,0	43,3	151,7
CPI-10	1889,2	17,3	41,3	192,4
CPI-11	2776,8	4,0	47,1	118,9
Linola derivada	1464,0	2,0	139,5	19,8

de_PMM				
Linola derivada de sobrenada nte	1470,0	0	81,4	11,8

[00105] Como pode ser visto das Tabelas V e VI, as propriedades funcionais do isolado de proteína de Linola derivado de sobrenadante e derivado de PMM eram muito semelhantes, como poderia ser esperado de suas propriedades de HPLC semelhantes, as principais diferenças sendo em características de emulsão, diferenças residindo entre as duas frações em capacidade de manutenção do óleo e tamanho globular.

[00106] Na maioria das categorias, a funcionalidade dos isolados de proteína de Linola derivados de sobrenadante era tão boa ou melhor do que os isolados de proteína de canola derivados de sobrenadante e derivado de PMM. O isolado de proteína de Linola derivado de sobrenadante e derivado de PMM eram mais fracos que o isolado derivado de sobrenadante no volume de espuma, mas a estabilidade da espuma de Linola era muito melhor.

Exemplo 7:

[00107] Esse exemplo ilustra a análise de isolados de proteína de Linola derivados de sobrenadante e derivados de PMM produzidos no Exemplo 5.

[00108] Análise por HPLC, realizada conforme descrito no pedido de patente americano co-pendente nº 10/413.371 depositado em 15 de abril de 2003 (WO

03/088670), requerido pelo requerente deste e a revelação a qual é incorporado aqui por referência, e dois isolados de Linola mostraram que cada isolado é constituído primariamente dos mesmos componentes, como podem ser vistos nas Figuras 1 e 2. Em ambos isolados de proteína de Linola, o principal componente de proteína tinha um peso molecular de aproximadamente 162.000 a 169.000 Da com menos componentes, um tendo um peso molecular na faixa de 16.000 a 17.000 Da e outro tendo um peso molecular de 415.000 a 440.000 Da. Esses resultados são resumidos nas seguintes Tabelas VII e VIII:

Tabela VII

Perfis por HPLC para Isolado de Proteína de Linola
derivado de PMM

Frações de Proteína	12S-Linina	7S-meia linina	2S-Colinina	Outros
% de picos de proteína	11,9	78,0	9,2	0,9
Peso médio em kDa	415-440	162-169	16-17	--

Tabela VIII

Perfis por HPLC para Isolado de Proteína de Linola
derivado de sobrenadante

Frações de Proteína	12S-Linina	7S-meia linina	2S-Colinina	Outros
% de picos de proteína	6,4	76,9	12,6	4,1
Peso médio em kDa	415-440	162-169	16-17	--

Exemplo 8:

[00109] Esse exemplo ilustra análise de aminoácidos.

[00110] Isolados de proteína de Linola preparados conforme descritos nos exemplos 3 e 5 foram analisados pelo teor de aminoácido.

[00111] A análise de aminoácido é apresentada na seguinte Tabela IX:

Tabela IX

Matéria seca em 100 g/g				
Peso médio de Aminoácido (1)	Aminoácido	Isolado derivado de PMM	Isolado derivado de sobrenadante	Isolado derivado de IEP
133,1	Aspártico	11,50	11,40	11,90
119,1	Treonina	3,97	3,80	3,77
105,1	Serina	4,74	4,87	4,88
204,2	Triptofano	1,84	1,81	1,75
146,1	Glutâmico	21,10	21,00	19,10
75,1	Glicina	5,61	5,62	5,26
89,1	Alanina	4,67	4,78	4,90
121,1	Cistina	1,30	1,28	0,96
117,1	Valina	5,30	5,70	5,92
149,2	Metionina	1,47	1,42	1,48
131,2	isoleucina	4,33	4,49	4,93
131,2	Leucina	5,33	5,36	5,76
181,2	Tirosina	2,29	2,36	2,25
165,2	Fenilalanina	4,85	4,86	5,86
155,2	Histidina	2,03	2,02	2,09
146,2	Lisina	2,73	2,34	2,69

174,2	Arginina	11,80	12,10	12,20
115,1	Prolina	3,71	3,87	4,05
--	Soma:	98,57	99,08	99,75
--	Peso ponderal médio aa (1)	134,75	135,33	136,43
--	Peso ponderal médio anidro (2)	116,74	117,32	118,41

Nota (1): Peso Molecular de aminoácidos "livre"

(2): Peso molecular Ponderal Médio de aminoácidos poliméricos. Nota: nenhum ajuste feito para Glutamina ou Asparagina, as quais são incluídas em Glutâmico e Aspártico respectivamente.

[00112] Os valores apresentados na Tabela IX representam aminoácidos na base de gramas por 100 gramas em peso seco. Os dados foram ajustados para a base de 100 gramas de aminoácido e os dados revisados são mostrados na seguinte Tabela X:

Tabela X

Resumo de aminoácido: 100 g de aminoácidos/g			
Aminoácido	Isolado derivado de PMM	Isolado derivado de sobrenadante	Isolado derivado de IEP
Aspártico*	11,7	11,5	11,9
Treonina ^c	4,0	3,8	3,8
Serina	4,8	4,9	4,9
Triptofano ^c	1,9	1,8	1,8

Glutâmico*	21,4	21,2	19,1
Glicina	5,7	5,7	5,3
Alanina	4,7	4,8	4,9
Cistina ^e	1,3	1,3	1,0
Valina ^e	5,4	5,8	5,9
Metionina ^e	1,5	1,4	1,5
isoleucina ^e	4,4	4,5	4,9
Leucina ^e	5,4	5,4	5,8
Tirosina	2,3	2,4	2,3
Fenilalanina ^e	4,9	4,9	5,9
Histidina ^e	2,1	2,0	2,1
Lisina ^e	2,8	2,4	2,7
Arginina ^e	12,0	12,2	12,2
Prolina	3,8	3,9	4,1
Soma:	100,0	100,0	100,0
Soma essencial aa:	45,6	45,6	47,5

e = 11 aminoácidos essenciais aa = aminoácidos

* = ácido Glutâmico e ácido aspártico incluem glutamina e asparagina respectivamente.

[00113] Como pode ser visto da Tabela IX e Tabela X, os perfis de aminoácido para isolados de proteína de Linola derivados de IEP e derivados de sobrenadante e derivados PMM são muito semelhantes.

[00114] Tabela IX inclui os pesos moleculares para aminoácidos individuais. Combinados com as quantidades individuais, os pesos moleculares médios para os aminoácidos "livres" para os três isolados de proteína são mostrados, e são todos cerca de 135 Da. Os peso moleculares

ponderais médio anidros são também mostrados desde que as proteínas sejam bipolímeros de aminoácidos anidros (cada menos uma molécula de água, excluindo um aminoácido terminal por polipeptídio). Os pesos moleculares de aminoácido polimérico médios são todos de cerca de 117 a 118 Da. Tabela X também indica os aminoácidos essenciais, os quais não podem ser sintetizados por humanos. O teor completo dos sete aminoácidos essenciais é muito semelhante aos três isolados de proteína.

Exemplo 9:

[00115] Esse exemplo ilustra análise de calorímetro diferencial de varredura de isolados de proteína de Linola.

[00116] Isolados de proteína de Linola preparados conforme descritos nos Exemplos 3 a 5 foram submetidos ao Calorímetro Diferencial de Varredura. Calorímetro Diferencial de Varredura é um método instrumental que mede a transição da fase que surge para biomoléculas. A amostra é colocada em uma panela selada com pouco de água ou solução tamponada e calor é aplicado em uma taxa constante, tal como 10°C/minuto, cobrindo uma faixa de temperatura específica, tal como 20°C a 150°C. Uma segunda panela, contendo água ou solução de tamponamento, é simultaneamente aquecida para agir como uma referência. Um termograma da entrada de energia, chamado fluxo de calor endodérmico, é registrado durante a elevação da temperatura. Complexos biológicos, tais como proteínas, absorvem energia e essa energia muda a conformação da molécula, desnaturando ou não a dobrando. Comportamento de desnaturação é específico para proteínas individuais, ou outras biomoléculas, e a análise

fornece a temperatura de desnaturação, T_D e a entalpia muda (ΔH) em Joules/gramas de amostra. O termograma mostra um "poço" de energia representando a transição da fase da proteína natural para desnaturada. O fundo do "poço" representa o valor T_D . A ausência de qualquer "poço" de energia indica que desnaturação completa ocorreu.

[00117] Como pode ser visto das Figuras 3,4 e 5, os isolados de proteína de Linola derivados de sobrenadante e derivados de PMM são semelhantes em termos de termoestabilidade, conforme poderia ser esperado de suas propriedades por HPLC semelhantes, com isolado de proteína de Linola derivado de sobrenadante tendo uma estabilidade levemente maior. O termograma pelo calorímetro Diferencial de Varredura para isolado de proteína de Linola derivado de IEP indica que esse isolado de proteína é substancialmente desnaturado em contraste com os isolados de proteína de Linola derivados de sobrenadantes e derivados de PMM os quais são substancialmente não desnaturados.

Resumo da Revelação

[00118] Em resumo dessa revelação, a presente invenção fornece um método para produzir isolados de proteína do linho no qual mucilagem primeiro é extraída do grão oleaginoso do linho para remoção do óleo do linho e preparação de farinha do grão oleaginoso do linho, permitindo maiores rendimentos de isolados de proteína a serem obtidos e maior flexibilidade no procedimento de isolamento a ser alcançado. A presente invenção ainda fornece novos isolados de proteína do linho tendo um único isolado de proteína. Modificações são possíveis dentro do escopo da invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparar um isolado de proteína do linho, caracterizado pelo fato de:

5 inicialmente extrair grãos oleaginosos do linho para remover mucilagem dos mesmos, em que a dita extração de grãos oleaginosos para remover mucilagem dos mesmos é efetuada usando uma solução aquosa brandamente alcalina de um material alcalino, de preferência tendo um pH de 7,5 a 9 e de preferência de uma concentração de 0,2 a 0,7 M de
10 material brandamente alcalino, em que a extração é efetuada em uma temperatura de 30°C a 70°C, de preferência 50°C e em uma relação de grão para solução de 1:1 a 1:20, de preferência 1:5 a 1:10;

esmagar os grãos oleaginosos extraídos para
15 recuperar o óleo e liberar uma farinha, e

processar a farinha para recuperar um isolado de proteína do linho da mesma.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é efetuado agitando o grão
20 oleaginoso na solução aquosa por 15 a 60 minutos, de preferência 30 a 60 minutos.

3. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2, caracterizado pelo fato de que existem múltiplas extrações de grão oleaginoso até que mucilagem
25 não seja mais extraída dos grãos oleaginosos.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o dito material brandamente alcalino é bicarbonato de sódio, de preferência usado como uma solução aquosa do bicarbonato
30 de sódio em seu pH natural.

5. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a dita farinha de grão oleaginoso do linho é processada para recuperar um isolado de proteína do linho por um procedimento incluindo precipitação isoelétrica de solução de proteína do linho de uma solução alcalina de proteína do linho produzida pela extração da farinha com uma solução alcalina aquosa.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que a dita farinha do grão oleaginoso é processada para recuperar uma solução de proteína do linho:

solubilizando proteína na dita farinha de grão oleaginoso do linho extraíndo uma solução de cloreto de sódio aquosa tendo uma resistência iônica de pelo menos 0,10 M a um pH de 5 a 7 para fornecer uma solução de proteína aquosa tendo uma concentração de 5 a 40 g/L,

concentrando a solução de proteína aquosa a uma concentração de pelo menos 150 g/L por uma técnica por membrana seletiva,

diluindo a solução de proteína concentrada com água tendo uma temperatura de menos que 15°C para formar micelas de proteína, e

coletando e recuperando as ditas micelas de proteína como uma massa micelar de proteína de isolado de proteína do linho.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a massa micelar de proteína é seca.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 6 ou 7,

caracterizado pelo fato de que o líquido residual da recuperação da massa micelar de proteína é processado para recuperar quantidades adicionais de isolado de proteína do linho.

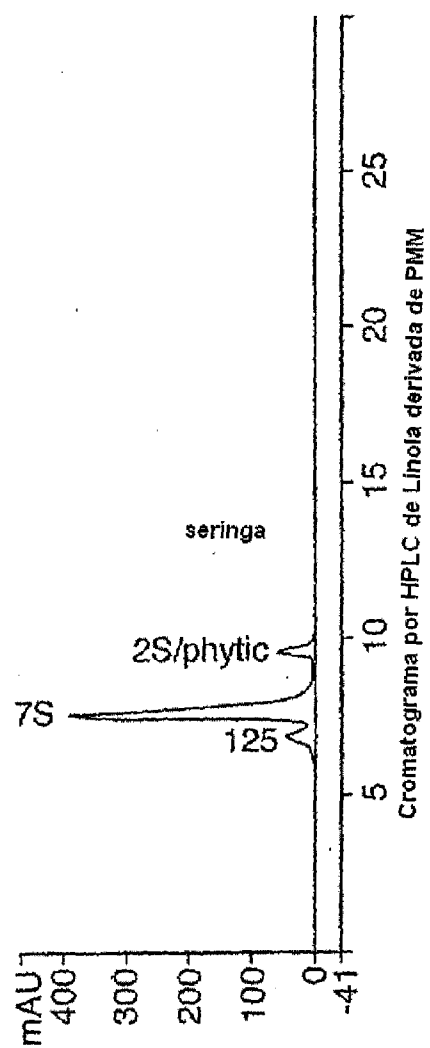


FIG.1

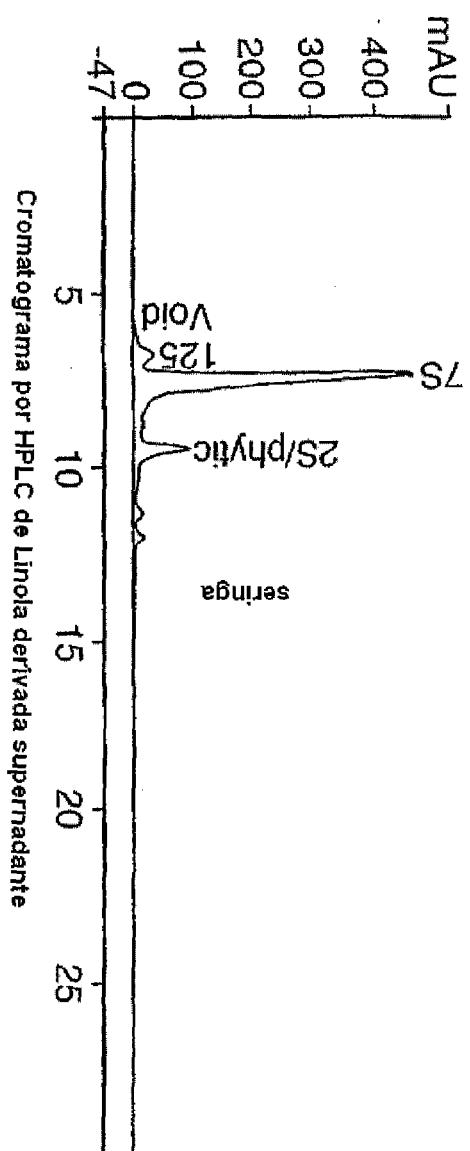


FIG.2

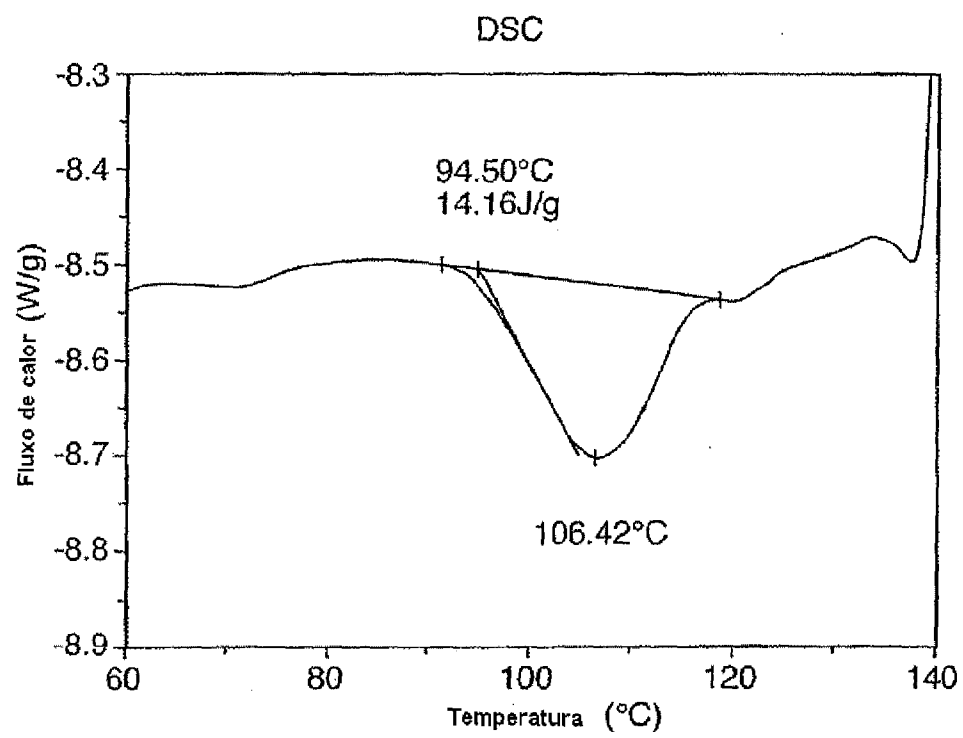


FIG.3

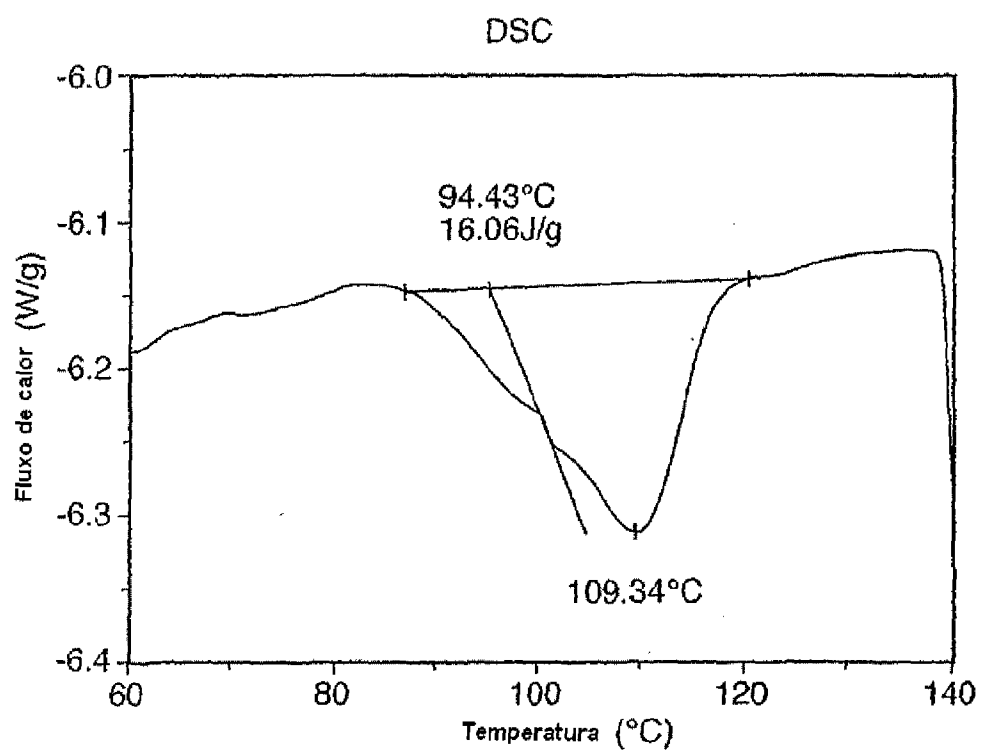


FIG.4

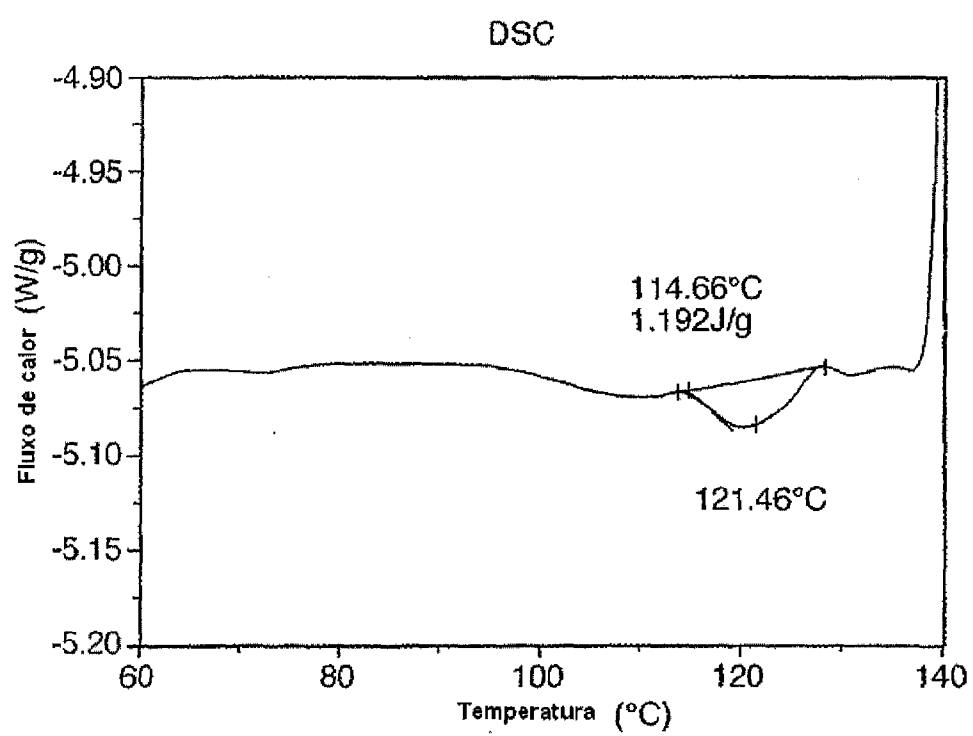


FIG.5

RESUMO

PROCESSO PARA PREPARAR UM ISOLADO DE PROTEÍNA DO LINHO

Isolados de proteína do linho são obtidos em um procedimento no qual grãos oleaginosos do linho são inicialmente extraídos para remover mucilagem dos mesmos antes de esmagar para recuperar o óleo e produzir uma farinha. A farinha de proteína do linho então é processada para recuperar um isolado de proteína do linho da mesma.