



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1933738 B

(45) 授权公告日 2010.06.23

(21) 申请号 200580008603.5

(22) 申请日 2005.01.20

(30) 优先权数据

60/537,031 2004.01.20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.09.18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/CA2005/000062 2005.01.20

(87) PCT申请的公布数据

W02005/067729 EN 2005.07.28

(73) 专利权人 伯康营养科学 (MB) 公司

地址 加拿大马尼托巴

(72) 发明人 M·施维策尔 B·E·格林

K·I·塞加尔 R·维拉德森

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公司 72001

代理人 刘玥

(51) Int. Cl.

A23J 1/14 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

(56) 对比文件

W0 03088760, 2003.10.30, 全文.

审查员 汪建斌

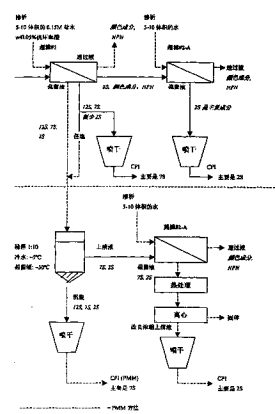
权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 1 页

(54) 发明名称

新型卡诺拉分离蛋白

(57) 摘要

一种主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成、溶解度性质改善的新型卡诺拉分离蛋白,其 2S 卡诺拉蛋白质比例提高,7S 卡诺拉蛋白质比例下降。所述新型卡诺拉分离蛋白通过对得自卡诺拉蛋白质胶束形成和沉淀的含水上清液进行热处理,促使 7S 蛋白质沉淀并将其沉析除去来形成。或者所述新型卡诺拉分离蛋白可得自选择性膜程序,其中将含有 12S、7S 和 2S 卡诺拉蛋白质的卡诺拉蛋白质水溶液进行第一选择性膜技术,以将 12S 和 7S 卡诺拉蛋白质保留在截留液中,所述截留液进行干燥,以提供主要由 7S 卡诺拉蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白,所述膜技术同时让 2S 卡诺拉蛋白质作为透过液通过膜,使所述透过液进行第二选择性膜技术,以保留 2S 卡诺拉蛋白质,而让低分子量污染物通过膜,并将后一膜技术所得的截留液干燥。



1. 一种卡诺拉分离蛋白,所述卡诺拉分离蛋白的特征在于主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成,以干重计(d. b.) 蛋白质含量为至少 90wt% (Nx6. 25),与主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成、得自卡诺拉蛋白质胶束形成和沉淀所得含水上清液的卡诺拉分离蛋白相比,其 2S 卡诺拉蛋白质比例提高并且 7S 卡诺拉蛋白质比例下降;

其中所述卡诺拉分离蛋白得自对所述含水上清液的热处理。

2. 一种卡诺拉分离蛋白,所述卡诺拉分离蛋白得自选择性膜程序,其中将得自卡诺拉油籽粕且含有 12S、7S 和 2S 卡诺拉蛋白质的卡诺拉蛋白质水溶液进行第一选择性膜技术,所述第一选择性膜技术选择性地将 12S 和 7S 卡诺拉蛋白质保留在截留液中,而让 2S 蛋白质作为透过液通过膜,使所述透过液进行第二选择性膜技术,所述第二选择性膜技术选择性地保留 2S 卡诺拉蛋白质,而让低分子量污染物作为透过液通过膜,并将得自第二选择性膜技术的截留液干燥。

3. 权利要求 1 或 2 要求保护的卡诺拉分离蛋白,所述卡诺拉分离蛋白其蛋白质含量以干重计(d. b.) 为至少 90wt% (Nx6. 25),且所述分离蛋白中存在的卡诺拉蛋白中含有至少 85wt% 的 2S 卡诺拉蛋白质和低于 15wt% 的 7S 卡诺拉蛋白质。

4. 权利要求 1 或 2 要求保护的卡诺拉分离蛋白,其特征就在于所述分离蛋白中存在的卡诺拉蛋白中含有至少 90wt% 的 2S 卡诺拉蛋白质和低于 10wt% 的 7S 卡诺拉蛋白质。

5. 权利要求 1 或 2 要求保护的卡诺拉分离蛋白,所述卡诺拉分离蛋白的蛋白质含量为至少 100wt% (Nx6. 25)d. b. 。

6. 一种制备 2S 卡诺拉蛋白质比例提高的卡诺拉分离蛋白的方法,其特征就在于:

(a) 提供主要由 2S 蛋白质组成的 2S 和 7S 蛋白质水溶液,

(b) 对所述水溶液进行热处理,使 7S 卡诺拉蛋白质沉淀,

(c) 从所述水溶液中除去沉淀的 7S 蛋白质,

(d) 回收蛋白质含量至少 90wt% (Nx6. 25)d. b. 、2S 卡诺拉蛋白质比例提高的卡诺拉分离蛋白。

7. 权利要求 6 要求保护的方法,其特征就在于所述热处理步骤在足以沉淀所述水溶液中所存在的至少 50wt% 的 7S 卡诺拉蛋白质的温度和时间条件下进行。

8. 权利要求 7 要求保护的方法,其特征就在于所述热处理步骤在足以沉淀所述水溶液中所存在的至少 75wt% 的 7S 卡诺拉蛋白质的温度和时间条件下进行。

9. 权利要求 6 或 7 要求保护的方法,其特征就在于,所述热处理步骤通过在 70° 至 100°C 的温度下加热所述水溶液 2 至 30 分钟来实现。

10. 权利要求 9 要求保护的方法,其特征就在于,所述热处理步骤通过在 75° 至 95°C 的温度下加热所述水溶液 5 至 15 分钟来实现。

11. 权利要求 6 或 7 要求保护的方法,其特征就在于所述 2S 和 7S 卡诺拉蛋白质水溶液是得自卡诺拉蛋白质胶束形成和沉淀的浓缩上清液,所述卡诺拉蛋白质胶束形成优选如下实现:

(a) 在至少 5°C 的温度下浸提卡诺拉油籽粕,导致所述卡诺拉油籽粕中的蛋白质溶解,形成蛋白质水溶液,

(b) 使所述蛋白质水溶液与残余油籽粕分离,

(c) 通过选择性膜技术,将所述蛋白质水溶液的浓度提高到至少 200g/L,同时保持离

子强度基本不变,以提供浓缩蛋白质溶液,

(d) 将所述浓缩蛋白质溶液稀释到温度低于约 15℃的冷水中,导致蛋白质胶束形成,

(e) 将上清液与沉析的蛋白质胶束团分离。

12. 权利要求 11 要求保护的方法,其特征在于所述上清液在进行所述热处理之前先浓缩至蛋白质浓度为 100 至 400g/L。

13. 权利要求 12 要求保护的方法,其特征在于所述上清液在进行所述热处理之前先浓缩至蛋白质浓度为 200 至 300g/L。

14. 权利要求 12 要求保护的方法,其特征在于所述浓缩步骤通过用分子量截留值为 3,000 至 100,000 道尔顿的膜进行超滤来实现,优选超滤所得的所述浓缩上清液在进行所述热处理步骤之前先进行渗析,所述渗析步骤优选 2 至 20 体积的水,用分子量截留值为 3,000 至 100,000 道尔顿的膜来进行。

15. 权利要求 12 要求保护的方法,其特征在于所述浓缩步骤通过用分子量截留值为 3,000 至 100,000 道尔顿的膜进行超滤来实现,优选超滤所得的所述浓缩上清液在进行所述热处理步骤之前先进行渗析,所述渗析步骤优选 5 至 10 体积的水,用分子量截留值为 3,000 至 100,000 道尔顿的膜来进行。

16. 一种制备卡诺拉分离蛋白的方法,其特征在于:

(a) 提供得自卡诺拉油籽粕并含有 12S、7S 和 2S 卡诺拉蛋白质的卡诺拉蛋白质水溶液,

(b) 使用有效保留 7S 和 12S 卡诺拉蛋白质在截留液中,而让 2S 蛋白质作为透过液通过膜的选择性膜技术,提高所述水溶液的蛋白质浓度,以提供浓缩蛋白质溶液,

(c) 干燥步骤 (b) 所得的截留液,以提供主要由 7S 卡诺拉蛋白质组成、以干重计 (d. b.) 蛋白质含量为至少 90wt% (Nx6.25) 的卡诺拉分离蛋白,

(d) 使用有效保留 2S 卡诺拉蛋白质在截留液中,而让低分子量污染物质通过膜进入透过液的选择性膜技术,提高步骤 (a) 所得的透过液的浓度,

(e) 干燥步骤 (d) 所得的截留液,以提供主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成、蛋白质含量为至少 90wt% (Nx6.25) d. b. 的卡诺拉分离蛋白。

17. 权利要求 16 要求保护的方法,其特征在于所述卡诺拉蛋白质水溶液如下提供:在至少 5℃的温度下浸提卡诺拉油籽粕,导致所述卡诺拉油籽粕中的蛋白质溶解,形成蛋白质含量 5 至 40g/L、pH 5 至 6.8 的蛋白质水溶液,并将所述蛋白质水溶液与残余油籽粕分离。

18. 权利要求 17 要求保护的方法,其特征在于步骤 (b) 如下实现:用分子量截留值为 30,000 至 150,000 道尔顿的超滤膜,将所述水溶液浓缩至蛋白质含量为至少 200g/L,同时保持离子强度基本不变,以提供浓缩蛋白质溶液,优选所述浓缩蛋白质溶液用 2 至 20 体积的渗析溶液进行渗析步骤。

19. 权利要求 18 要求保护的方法,其特征在于所述超滤膜的分子量截留值为 50,000 至 100,000 道尔顿,并且所述渗析步骤用 5 至 10 体积的渗析溶液进行。

20. 权利要求 16-19 中任一项要求保护的方法,其中步骤 (d) 如下实现:用分子量截留值为 3,000 至 30,000 道尔顿的膜,将透过液的浓度提高到蛋白质浓度为 100 至 400g/L,以提供截留液。

21. 权利要求 16-19 中任一项要求保护的方法,其中步骤 (d) 如下实现:用分子量截留值为 5,000 至 10,000 道尔顿的膜,将透过液的浓度提高到蛋白质浓度为 200 至 300g/L,以

提供截留液,并且所述截留液用 2 至 20 体积的渗析溶液进行渗析步骤

22. 权利要求 6、7 或 8 要求保护的方法,其特征在于所述主要由 2S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白具有至少 100wt%的蛋白质含量。

23. 权利要求 12-15 中任一项要求保护的方法,其特征在于所述主要由 2S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白具有至少 100wt%的蛋白质含量。

24. 权利要求 1-5 中任一项要求保护的卡诺拉分离蛋白的水溶液。

25. 权利要求 24 要求保护的卡诺拉分离蛋白水溶液,其为卡诺拉分离蛋白强化的软饮料。

新型卡诺拉分离蛋白

发明领域

[0001] 本发明涉及卡诺拉 (canola) 分离蛋白的生产。

[0002] 发明背景

[0003] 蛋白质含量至少 100wt% (Nx6.25) 的卡诺拉油籽分离蛋白, 可通过 2002 年 5 月 3 日提交的共同待审美国专利申请第 10/137,391 号 (WO 02/089597) 中所述的方法从油籽粕制得, 所述专利申请转让至其受让人, 其公开内容通过引用结合到本文中。所述方法程序包括多步骤过程: 用盐溶液浸提卡诺拉油籽粕; 使所得蛋白质水溶液与残余油籽粕分离; 使用选择性膜技术, 将所述水溶液的蛋白质浓度提高至至少约 200g/L, 同时保持离子强度基本不变; 将所得浓缩蛋白质溶液稀释至冷水中, 以导致形成蛋白质胶束; 让蛋白质胶束沉析形成无定形、粘稠、凝胶状的面筋样蛋白质胶束团 (PMM); 和从上清液中回收蛋白质含量至少约 100wt% (Nx6.25) 的蛋白质胶束团。本文所用的蛋白质含量以干重计。回收的 PMM 可干燥。

[0004] 在所述方法的一个实施方案中, 对 PMM 沉析步骤所得上清液进行加工, 以从上清液中回收卡诺拉分离蛋白。可首先用超滤膜浓缩上清液, 然后将浓缩物干燥, 来实现这个程序。所得卡诺拉分离蛋白的蛋白质含量至少约 90wt%, 优选至少约 100wt% (Nx6.25)。

[0005] 美国专利申请第 10/137,391 号中所述的程序基本上是分批程序。在 2002 年 11 月 19 日提交的共同待审美国专利申请第 10/298,678 号 (WO 03/043439) 中, 描述了制备卡诺拉分离蛋白的连续方法, 所述专利申请转让至其受让人, 其公开内容通过引用结合到本文中。根据所述方法, 将卡诺拉油籽粕与盐溶液连续混合, 通过管道输送所得混合物, 同时使蛋白质从卡诺拉油籽粕中浸提出来, 形成蛋白质水溶液, 将所述蛋白质水溶液连续输送通过选择性膜操作, 使所述蛋白质水溶液的蛋白质含量提高至至少约 50g/L, 同时保持离子强度基本不变, 将所得浓缩蛋白质溶液与冷水连续混合, 以促使形成蛋白质胶束, 让所述蛋白质胶束连续沉析, 同时连续溢出上清液, 直到在沉析槽中积累了所需量的 PMM。从沉析槽中回收 PMM, 且可加以干燥。所述 PMM 的蛋白质含量至少约 90wt% (Nx6.25), 优选至少约 100wt%。可如上所述对溢出的上清液进行加工, 以从中回收卡诺拉分离蛋白。

[0006] 已知卡诺拉种子含有约 10 至约 30wt% 的蛋白质, 且已鉴定出几种不同的蛋白质成分。这些蛋白质包括 12S 球蛋白 (称十字花科蛋白)、7S 蛋白质和 2S 储存蛋白质 (称油菜籽蛋白)。如 2003 年 4 月 15 日提交的共同待审美国专利申请第 10/413,371 号 (WO 03/088760) 中所述, 上述程序包括稀释浓蛋白质水溶液以形成 PMM 和加工上清液以回收另外的蛋白质, 导致回收具有不同蛋白质分布 (profile) 的分离物, 所述专利申请转让至其受让人, 其公开内容通过引用结合到本文中。

[0007] 这样, PMM 衍生的卡诺拉分离蛋白的蛋白质成分含量为约 60 至约 98wt% 的 7S 蛋白质, 约 1 至约 15wt% 的 12S 蛋白质和 0 至约 25wt% 的 2S 蛋白质。上清液衍生的卡诺拉分离蛋白的蛋白质成分含量为约 60 至约 95wt% 的 2S 蛋白质, 约 5 至约 40wt% 的 7S 蛋白质和 0 至约 5wt% 的 12S 蛋白质。因此, PMM 衍生的卡诺拉分离蛋白主要是 7S 蛋白质, 而上清液衍生的卡诺拉分离蛋白主要是 2S 蛋白质。如在上述美国专利申请第 10/413,371 号

中所述, 2S 蛋白质的分子大小约为约 14,000 道尔顿, 7S 蛋白质的分子量约为 145,000 道尔顿, 12S 蛋白质的分子大小约为 290,000 道尔顿。

[0008] 卡诺拉也称油菜 (rapeseed 或 oil seed rape)。

[0009] 发明概述

[0010] 令人惊奇地发现, 有一种新型卡诺拉分离蛋白, 其 2S 蛋白质比例提高, 优选含有至少约 85wt% 的 2S 蛋白质, 而其 7S 蛋白质比例下降, 所述新型卡诺拉分离蛋白比起按上述美国专利申请第 10/137,391 号的程序制备的上清液衍生卡诺拉分离蛋白, 在水溶液中显示出更优越的特性。

[0011] 本文提供的新型卡诺拉分离蛋白除在各种 pH 值下溶解度提高外, 还能够使软饮料溶液的澄清度提高, 从而提供澄清的蛋白质强化软饮料。

[0012] 因此, 本发明的一个方面提供主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成、以干重计 (d. b.) 蛋白质含量为至少约 90wt% (Nx6.25) 的卡诺拉分离蛋白, 所述卡诺拉分离蛋白与主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成、得自卡诺拉蛋白质胶束形成和沉淀所得含水上清液的卡诺拉分离蛋白相比, 其 2S 卡诺拉蛋白质比例提高, 7S 卡诺拉蛋白质比例下降。

[0013] 本发明的又一个方面提供以干重计 (d. b.) 蛋白质含量为至少约 90wt% (Nx6.25) 的卡诺拉分离蛋白, 所述卡诺拉分离蛋白中含有至少约 85wt% 的 2S 卡诺拉蛋白质和低于约 15wt% 的 7S 卡诺拉蛋白质。

[0014] 可通过对美国专利申请第 10/137,391 号的程序所得的浓缩上清液进行热处理, 以降低浓缩上清液中的 7S 蛋白质比例, 从而提高 2S 蛋白质比例, 来制备所述新型卡诺拉分离蛋白。因此, 本发明的另一个方面提供制备 2S 卡诺拉蛋白质比例提高的卡诺拉分离蛋白的方法, 所述方法包括 (a) 提供主要由 2S 蛋白质组成的 2S 和 7S 蛋白质水溶液, (b) 对所述水溶液进行热处理, 以导致 7S 卡诺拉蛋白质沉淀, (c) 从所述水溶液中除去降解沉淀的 7S 蛋白质, 和 (d) 回收蛋白质含量至少 90wt% (Nx6.25) d. b., 2S 卡诺拉蛋白质比例提高的卡诺拉分离蛋白。

[0015] 或者, 所述新型卡诺拉分离蛋白可通过如下程序制备: 从卡诺拉油籽粕浸提蛋白质后, 使所得蛋白质溶液进行第一选择性膜步骤, 所用膜的分子量截留值允许 2S 蛋白质通过膜进入透过液中, 而 7S 和白质组成的第一卡诺拉分离蛋白。第一选择性膜方法步骤所得的透过液则进行第二选择性膜步骤, 所用膜的分子量截留值保留 2S 蛋白质而允许低分子量污染物质 (包括盐、酚类物质和抗营养物质) 通过。然后干燥后一选择性膜步骤所得的截留液, 以提供主要由 2S 蛋白质组成, 为新型分离蛋白的第二卡诺拉分离蛋白。

[0016] 因此, 本发明另外的一个方面提供制备卡诺拉分离蛋白的方法, 所述方法包括 (a) 提供得自卡诺拉油籽粕, 含有 12S、7S 和 2S 卡诺拉蛋白质的卡诺拉蛋白质水溶液, (b) 使用能有效保留 7S 和 12S 卡诺拉蛋白质在截留液中, 而让 2S 蛋白质通过膜进入透过液的选择性膜技术, 提高所述水溶液的蛋白质浓度, 以提供浓缩蛋白质溶液, (c) 干燥步骤 (b) 所得的截留液, 以提供主要由 7S 卡诺拉蛋白质组成, 以干重计 (d. b.) 蛋白质含量为至少约 90wt% (Nx6.25) 的卡诺拉分离蛋白, (d) 使用能有效保留 2S 卡诺拉蛋白质在截留液中, 而让低分子量污染物质通过膜进入透过液的选择性膜技术, 提高步骤 (a) 所得的透过液的浓度, 和 (e) 干燥步骤 (d) 所得的截留液, 以提供主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成, 蛋白质含量为至少约 90wt% (Nx6.25) d. b. 的卡诺拉分离蛋白。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1 是附加于蛋白质胶束方法上的本发明一个实施方案的蛋白质溶液回收方法示意图。

[0019] 发明详述

[0020] 本文提供的新型卡诺拉分离蛋白其蛋白质至少约 90wt% (Nx6.25), 优选至少约 100wt%, 可通过分批方法、连续方法或半连续方法从卡诺拉油籽粕分离制得。

[0021] 本文提供的新型卡诺拉分离蛋白主要由 2S 蛋白质组成, 其与主要由 2S 蛋白质组成、在相同的制备实验条件下得自卡诺拉蛋白质胶束形成和沉淀所得上清液的卡诺拉分离蛋白相比, 其 2S 卡诺拉蛋白质比例提高, 7S 卡诺拉蛋白质比例下降。

[0022] 所述新型卡诺拉分离蛋白含有至少约 85wt% 的 2S 卡诺拉蛋白质和低于约 15wt% 的 7S 卡诺拉蛋白质, 优选至少约 90wt% 的 2S 卡诺拉蛋白质和低于约 10wt% 的 7S 卡诺拉蛋白质, 更优选 2S 蛋白质的比例尽可能高。如上所述, 这种卡诺拉分离蛋白可通过对浓缩上清液进行热处理来获得, 这在下文中作更详细的描述。对浓缩上清液的热处理造成 7S 蛋白质沉淀, 后者可通过任何方便方法如离心从经热处理的上清液中除去。2S 蛋白质不受热处理影响, 因而热处理通过降低 7S 蛋白质的比例来提高 2S 蛋白质的比例。

[0023] 所述新型卡诺拉分离蛋白可溶于 pH 值范围很广的水溶液中, 其与主要由 2S 蛋白质组成、在相同的制备实验条件下得自卡诺拉蛋白质胶束形成和沉淀所得上清液的卡诺拉分离蛋白相比, 通常具有更高的溶解度。此外, 所述新型卡诺拉分离蛋白在软饮料 (包括充碳酸气软饮料, 如可市售获得的软饮料) 中的水溶液, 与从主要由 2S 蛋白质组成、在相同的制备条件下得自卡诺拉蛋白质胶束形成和沉淀所得上清液的卡诺拉分离蛋白产生的水溶液相比, 具有更高的澄清度。

[0024] 卡诺拉分离蛋白在水溶液 (包括在软饮料中的溶液) 中的浓度可根据溶液的预定用途而改变。一般来说, 蛋白质浓度可在约 0.1 至约 30wt%, 优选约 1 至约 5wt% 之间变化。

[0025] 提供卡诺拉分离蛋白的方法的起始步骤包括使卡诺拉油籽粕中的蛋白质类物质溶解出来。从卡诺拉油籽粕回收得到的蛋白质类物质可能是卡诺拉油籽中天然存在的蛋白质, 或者所述蛋白质类物质可能是经遗传操作改良但仍具有天然蛋白质的特有疏水性质和极性性质的蛋白质。卡诺拉粕可以是卡诺拉油籽除去卡诺拉油后得到的任何卡诺拉粕, 由于例如使用热己烷浸出方法或者冷油挤出方法, 其中含有的非变性蛋白质水平有所变动。从卡诺拉油籽除去卡诺拉油通常是通过与本文描述的分离蛋白回收程序分开的操作过程来实现的。

[0026] 蛋白质溶解通过使用食品级盐溶液来实现最为有效, 因为盐的存在增强了可溶性蛋白质从油籽粕中的除去。在预期卡诺拉分离蛋白作非食品用途的情况下, 可使用食品级化学药品。盐通常是氯化钠, 但也可使用其他盐, 如氯化钾。盐溶液的离子强度至少约为 0.05, 优选至少约为 0.10, 以使相当数量的蛋白质的溶解得以实现。随着盐溶液的离子强度不断提高, 油籽粕中的蛋白质的溶解程度开始上升, 最后达到最大值。随后离子强度的任何提高都不会增加溶解的总蛋白质。引起最大蛋白质溶解程度的食品级盐溶液离子强度所选择的油籽粕而有所变化。

[0027] 考虑到随着离子强度的提高, 为沉析蛋白质所需的稀释程度也要更高, 通常优选采用的离子强度值小于约 0.8, 更优选离子强度值为约 0.1 至约 0.15。

[0028] 在分批方法中,蛋白质的盐溶解在至少约 5℃ 的温度下,优选在最高达约 35℃ 下实现,优选同时进行搅拌,以减少溶解时间,所述时间通常为约 10 分钟至约 60 分钟。优选所实现的溶解作用要能从油籽粕中充分浸提出尽可能多的蛋白质,以获得总体上较高的产物得率。

[0029] 温度下限选定为约 5℃,是因为低于此温度时溶解作用慢得无法进行,而优选的温度上限选定为约 35℃,是因为在分批模式下,温度更高时所述方法会变得不经济。

[0030] 在连续方法中,从卡诺拉油籽粕浸提蛋白质是通过适合实现从卡诺拉油籽粕连续浸提蛋白质的任何方式来进行的。在一个实施方案中,卡诺拉油籽粕与食品级盐溶液连续混合,所得混合物通过具有一定长度的管道或者导管输送,输送流速达成的停留时间足以实现期望依照本文所述参数进行的浸提作用。在这种连续程序中,盐溶解步骤在最长为约 10 分钟的时间内快速完成,优选所实现的溶解作用从油籽粕中充分浸提出尽可能多的蛋白质。连续程序中的溶解过程优选在高温下完成,优选至少约 35℃,通常最高达约 65℃。

[0031] 食品级盐水溶液其 pH 通常约 5 至约 6.8,优选约 5.3 至约 6.2,

[0032] 食品级盐水溶液其 pH 通常约 5 至约 6.8,优选约 5.3 至约 6.2,可按需使用任何合宜的酸(通常是盐酸)或者碱(通常是氢氧化钠),将盐溶液的 pH 调至约 5 至约 6.8 范围的任何期望数值。

[0033] 在溶解步骤进行过程中,食品级盐溶液中的油籽粕浓度可能变化很大。典型的浓度值为约 5 至约 15% w/v。

[0034] 用盐水溶液进行的蛋白质浸提步骤具有溶解卡诺拉粕中可能存在的脂类的额外效果,这会导致水相中存在脂类。

[0035] 浸提步骤所得的蛋白质溶液的蛋白质浓度通常为约 5 至约 40g/L,优选为约 10 至约 30g/L。

[0036] 盐水溶液中可含有抗氧化剂。所述抗氧化剂可以是任何合宜的抗氧化剂,如亚硫酸钠或者抗坏血酸。所采用的抗氧化剂量在占溶液的约 0.01 至约 1wt% 之间变化,优选约 0.05wt%。抗氧化剂用以抑制蛋白溶液中酚类物质的氧化。

[0037] 可通过任何便利方式,使浸提步骤所得的水相与残余卡诺拉粕分离,例如通过采用离心,接着通过碟式离心法和/或过滤,除去残余的粕。分离出的残余粕可进行干燥,以便处置。

[0038] 可通过将粉状活性炭或者其他色素吸附剂与分离出的蛋白质水溶液混合,然后便利地通过过滤法除去吸附剂,以提供蛋白质溶液,改善最终卡诺拉分离蛋白的颜色,使其颜色较浅,黄颜色较淡。也可使用渗析法除去色素。

[0039] 所述色素去除步骤可在任何合宜的条件下进行,通常在分离出的蛋白质水溶液的环境温度下,采用任何合适的色素吸附剂来进行。对于粉状活性炭,用量为约 0.025% 至约 5% w/v,优选约 0.05% 至约 2% w/v。

[0040] 在卡诺拉油籽粕含有相当数量的脂类的情况下,如在美国专利第 5,844,086 号和第 6,005,076 号(转让至其受让人,其公开内容通过引用结合到本文中)中所描述的,那么可将这两个专利中描述的除油步骤实施于分离的蛋白质水溶液和下文讨论的浓缩蛋白质水溶液。当进行

[0041] 作为用盐水溶液浸提油籽粕的替代方案,所述浸提可只用水来进行,尽管比起盐

水溶液,只用水往往从油籽粕浸提出较少的蛋白质。在采用这种替代方案的情况下,可将盐以上述浓度加入到从残余油籽粕分离出的蛋白质溶液中,以使蛋白质在下述浓缩步骤中保留在溶液中。当进行第一脱脂步骤时,盐通常是在这种操作完成后加入。

[0042] 另一种程序是在相对较高的 pH 值下,即高于约 6.8,通常最高达约 9.9 下,用食品级盐溶液浸提油籽粕。可通过使用任何合宜的食品级碱,如氢氧化钠水溶液,将食品级盐溶液的 pH 调至期望的碱性值。或者,可在相对较低的 pH 值下,即低于约 pH 5,通常低至约 pH3 下,用盐溶液浸提油籽粕。在使用这种另选方案的情况下,随后可通过任何便利方式,使油籽粕浸提步骤所得的水相与残余卡诺拉粕分离,例如通过采用离心法,接着通过碟式离心法和 / 或过滤,除去残余的粕。分离出的残余粕可进行干燥,以便处置。

[0043] 然后,如上所述,将在高或者低 pH 浸提步骤中获得的蛋白质水溶液的 pH 调至约 5 至约 6.8 的范围,优选在约 5.3 至约 6.2 的范围,接着再如下文所讨论作进一步的处理。可适当使用任何合宜的酸(如盐酸)或者碱(如氢氧化钠),进行所述 pH 调整。

[0044] 取决于是要沉淀出富含 7S 的蛋白质胶束团,留下上清液,以供加工形成新型卡拉分离蛋白,还是不要沉淀出蛋白质胶束团,而通过二膜操作加工蛋白质水溶液,以获得新型卡诺拉分离蛋白,可用两种择一(alternative)程序对蛋白质水溶液进行加工。

[0045] 在第一种择一程序中,将蛋白质水溶液浓缩,以提高溶液中的蛋白质浓度,同时保持溶液中的离子强度基本不变。进行这种浓缩操作,通常是为了提供蛋白质浓度为至少约 50g/L,优选至少为约 200g/L,更优选至少为约 250g/L 的浓缩蛋白质溶液。

[0046] 可通过任何适合分批或者连续操作的便利方式,如通过采用任何合宜的选择性膜技术(如超滤或者渗析),来进行浓缩步骤,使用的膜例如中空纤维膜或者螺旋错流膜,视不同的膜材质及形式而定,其合适分子量截留值如约 3,000 至约 100,000 道尔顿,优选约 5,000 至约 10,000 道尔顿,对于连续操作,确定膜的尺寸,以允许蛋白质水溶液透过膜时能够获得期望的浓缩程度。

[0047] 然后,可使用摩尔浓度和 pH 与浸提溶液相同的盐水溶液,对浓缩蛋白质溶液进行渗析步骤。这种渗析操作可通过使用约 2 至约 20 体积的渗析溶液,优选约 5 至约 10 体积的渗析溶液来进行。在渗析操作中,通过使透过液通过膜,使另外的污染物从蛋白质水溶液中除去。渗析操作可进行到透过液中没有另外相当数量的酚类物质和可见颜色存在为止。这种渗析操作可用浓缩步骤的相同膜来进行。但是,如需要,可用分子量截留值不同的单独膜来进行这个渗析操作,例如视不同的膜材质及形式而定,所述膜的分子量截断值在约 3,000 至约 100,000 道尔顿的范围,优选约 5,000 至约 10,000 道尔顿的范围。

[0048] 在渗析步骤的至少一部分过程中,在渗析介质中可存在抗氧化剂。所述抗氧化剂可以是任何合宜的抗氧化剂,如亚硫酸钠或者抗坏血酸。渗析介质中采用的抗氧化剂的量取决于所采用的材料,可在约 0.01 至约 1wt% 的范围变动,优选为约 0.05wt%。抗氧化剂用以抑制浓缩卡诺拉分离蛋白溶液中存在的酚类物质的氧化。

[0049] 浓缩步骤和渗析步骤可在任何合宜的温度下进行,通常为约 20℃至约 60℃,优选为约 20℃至约 30℃,进行的时间足以实现期望的浓缩程度。所用的温度和其他条件在一定程度上取决于用以进行浓缩操作的膜设备和期望的溶液蛋白质浓度。

[0050] 在浓缩步骤中将蛋白质溶液浓缩至高于约 200g/L 的优选浓度,不仅将方法得率提高到高于约 40%,优选高于约 80%的水平(以回收为干分离蛋白的浸提蛋白质的比例

计),而且还降低了干燥后最终分离蛋白的盐浓度。控制分离蛋白的盐浓度的能力对于分离蛋白的应用是很重要的,盐浓度的变化会影响具体食品应用中的功能性质和感观性质。

[0051] 众所周知,超滤及类似的选择性膜技术允许低分子量物质通过,而阻止较高分子量的物质通过。低分子量物质不仅包括食品级盐的离子,也包括从原始材料中浸提出来的低分子量物料,如碳水化合物、色素和抗营养因子,以及任何低分子量形式的蛋白质。视不同的膜材质及形式而定,通常选定膜的分子量截断值,以保证相当比例的蛋白质得以保留在溶液中,同时又让污染物通过。

[0052] 如美国专利第 5,844,086 号和第 6,005,076 号所描述的,如有需要,可对浓缩和任选渗析过的蛋白质溶液进行进一步的除油操作。

[0053] 作为上述脱色操作的替代方案,可对浓缩和任选渗析过的蛋白质溶液进行脱色操作。在这里,可使用粉状活性炭以及颗粒状活性炭(GAC)。可用作颜色吸附剂的另一种材料是聚乙烯吡咯烷酮。

[0054] 颜色吸附剂处理步骤可在任何便利条件下进行,通常在卡诺拉蛋白质溶液的环境温度下进行。对于粉状活性炭,用量可以为约 0.025%至约 5% w/v,优选约 0.05%至约 2% w/v。当用聚乙烯吡咯烷酮作为颜色吸附剂时,用量可以为约 0.5%至约 5% w/v,优选约 2%至约 3% w/v。可通过任何便利手段,如通过过滤,将颜色吸附剂从卡诺拉蛋白质溶液中除去。

[0055] 可对从任选脱色步骤获得的浓缩和任选渗析过的蛋白质溶液进行巴氏灭菌,以杀灭任何细菌,所述细菌可能因为保藏或者其他原因在原来的粕中早已存在,且在浸提步骤中被从粕中浸提到卡诺拉分离蛋白溶液中。这种巴氏灭菌可在任何期望的巴氏灭菌条件下进行。通常,将浓缩和任选渗析过的蛋白质溶液加热到约 55°至约 70°C 的温度,优选约 60°至约 65°C,保持约 10 至约 15 分钟,优选约 10 分钟。然后可将巴氏灭菌过的浓缩蛋白质溶液冷却,优选冷却至约 25°至约 40°C 的温度,以供如下所述进行进一步的处理。

[0056] 取决于浓缩步骤和任选的渗析步骤中所采用的温度,以及是否进行了巴氏灭菌步骤,浓缩蛋白质溶液可加热至至少约 20°C,最高达约 60°C 的温度,优选至约 25°至约 40°C,以降低浓缩蛋白质溶液的粘度,促进随后的稀释步骤和胶束形成的进行。浓缩蛋白质溶液不应被加热至超过一定的温度,超过所述温度的浓缩蛋白质溶液用冷水稀释时不发生胶束形成。

[0057] 然后,通过将浓缩步骤和任选渗析步骤、任选脱色步骤、任选巴氏灭菌步骤及任选除油步骤得到的浓缩蛋白质溶液与为实现期望稀释程度所需体积的冷水混合,对浓缩蛋白质溶液进行稀释,以促使胶束形成。取决于需要通过胶束途径获得的卡诺拉蛋白质的比例和从上清液获得的卡诺拉蛋白质的比例,浓缩蛋白质溶液的稀释程度可有所不同。一般来说,稀释水平越高,卡诺拉蛋白质保留在水相中的比例也越高。

[0058] 当期望通过胶束途径提供最大比例的蛋白质时,浓缩蛋白质溶液稀释约 15 倍或者更低,优选稀释约 10 倍或者更低。

[0059] 与浓缩蛋白质溶液混合的冷水的温度低于约 15°C,通常为 3°C至约 15°C,优选低于约 10°C,因为在所用的稀释倍数下,用所述较低温度获得的蛋白质胶束团形式的分离蛋白的得率会提高。

[0060] 在分批操作中,可将各批浓缩蛋白质溶液加入到上述期望体积的静止冷水体中。

浓缩蛋白质溶液的稀释和随之发生的离子强度降低导致形成胶束状不连续蛋白质小滴形式的高度结合蛋白质分子的云状团块。在分批程序中,让蛋白质胶束在冷水体中沉析,以形成聚集、凝聚、浓厚、无定形的粘性面筋样蛋白质胶束团(PMM)。可例如通过离心帮助沉析。这种诱导的沉析过程降低蛋白质胶束团的液体含量,从而降低水分含量,从通常约 70% (重量) 至约 95% (重量) 降低到通常约 50% (重量) 至约 80% (重量) 的数值,以总胶束团的重量计。以这种方式降低胶束团的水分含量还能降低胶束团中夹杂的盐含量,并因此降低干燥分离蛋白的盐含量。

[0061] 或者,可如下连续进行稀释操作:连续使浓缩蛋白质溶液输入 T 形管的一个入口,同时使稀释用水注入 T 形管的另一个入口,使它们在管道中混合。稀释用水注入 T 形管的流速足以实现浓缩蛋白质溶液的期望稀释程度。

[0062] 浓缩蛋白质溶液和稀释用水在管道中的混合引发蛋白质胶束的形成,将所得混合物从 T 形管的出口输入到沉析槽中,沉析槽注满时让上清液溢出。优选以尽量减少液体水体内部湍流的方式,将混合物注入沉析槽中的所述液体水体中。

[0063] 在连续程序中,让蛋白质胶束在沉析槽中沉析,以形成聚集、凝聚、浓厚、无定形、粘性的面筋样蛋白质胶束团(PMM),所述程序继续进行到已在沉析槽的底部积聚了期望量的 PMM,此时从沉析槽中除去积聚的 PMM。作为通过沉淀法沉析的替代,还可通过离心法连续分离 PMM。

[0064] 将蛋白质溶液浓缩至至少约 200g/L 的优选蛋白质含量和使用小于约 15 的稀释倍数这两个方法参数的组合,导致获得更高的得率,且往往是相当高的得率,所述得率就从原始粕浸提物回收得到蛋白质胶束团形式的蛋白质而言,而且还导致获得纯度更高的分离蛋白,所述纯度就与使用上述美国专利中描述的任何公知现有分离蛋白产生程序获得的蛋白质含量相比较而言。

[0065] 与分批方法相比,通过采用连续方法回收卡诺拉分离蛋白时,对于同样的蛋白质浸提水平,起始蛋白质浸提步骤的时间显著降低,且在浸提步骤中可使用相当高的温度。此外,在连续程序中,发生污染的机会比分批程序的要低,这导致产物质量更高,且可在更紧凑的设备中进行连续过程。

[0066] 可例如通过将残余水相滗析出沉析的团块,或者通过离心法,将沉析的分离蛋白与残余水相或者上清液分离。PMM 可以以湿品形式使用,或者可通过任何便利技术,如喷雾干燥法或冷冻干燥法干燥成干品形式。干燥 PMM 的蛋白质含量高,超过约 90wt% 蛋白质,优选至少约 100wt% 蛋白质(以凯氏 N_x6.25 计算),且基本不发生变性(通过差示扫描量热法测定)。当按需采用美国专利第 5,844,086 号和第 6,005,076 号的程序时,从脂肪油籽粕分离得到的干燥 PMM 还具有较低的残余脂肪含量,可低于约 1wt%。

[0067] 如上述美国专利申请第 10/413,371 号中所描述,PMM 主要由 7S 卡诺拉蛋白质组成,其蛋白质成分含量为约 60 至 98wt% 的 7S 蛋白质,约 1 至约 15wt% 的 12S 蛋白质和 0 至约 25wt% 的 2S 蛋白质。

[0068] PMM 形成和沉析步骤得到的上清液含有相当数量的不能在稀释步骤中沉析的卡诺拉蛋白质,因此对其进行处理,以从中回收卡诺拉分离蛋白。如上述美国专利申请第 10/413,371 号中所描述,得自上清液的卡诺拉分离蛋白主要由 2S 卡诺拉蛋白质组成,其蛋白质成分含量为约 60 至约 95wt% 的 2S 蛋白质,约 5 至约 40wt% 的 7S 蛋白质和 0 至约

5wt%的 12S 蛋白质。

[0069] 稀释步骤得到的上清液在除去 PMM 之后进行浓缩,以提高其中的蛋白质浓度。可通过采用任何便利选择性膜技术(如超滤),使用具有合适的分子量截断值,允许低分子量物质(包括盐和其他从蛋白质原始材料浸提出来的非蛋白质低分子量物料)通过,同时又能使卡诺拉蛋白质保留在溶液中的膜,来进行所述浓缩过程。视不同的膜材质及形式而定,可使用分子量截断值为约 3,000 至 100,000 道尔顿,优选 5,000 至 10,000 道尔顿的超滤膜。用这种方式浓缩上清液还能减少为回收蛋白质所要干燥的液体的体积。通常在上清液干燥前,先浓缩至蛋白质浓度为至少约 50g/L,优选约 100 至约 400g/L,更优选约 200 至约 300g/L。如以上对蛋白质溶液浓缩步骤所述的,这种浓缩操作可以以分批模式进行,或者以连续操作方式进行。

[0070] 然后,可用水对浓缩的上清液进行渗析步骤。这个渗析操作可通过使用约 2 至约 20 体积的渗析溶液,优选约 5 至约 10 体积的渗析溶液来进行。在渗析操作中,通过使另外的污染物随透过液通过膜而从含水上清液中除去。渗析操作可进行到透过液中没有另外相当数量的酚类物质和可见颜色存在为止。这个渗析操作可用浓缩步骤的相同膜来进行。但是,如需要,可用单独的膜来进行这个渗析操作,例如视不同的膜材质及形式而定,所述膜的分子量截断值在约 3,000 至约 100,000 道尔顿的范围,优选约 5,000 至约 10,000 道尔顿的范围。

[0071] 在渗析步骤的至少一部分过程中,在渗析介质中可存在抗氧化剂。所述抗氧化剂可以是任何合宜的抗氧化剂,如亚硫酸钠或者抗坏血酸。渗析介质中采用的抗氧化剂的量取决于所采用的材料,可在约 0.01 至约 1wt%的范围变动,优选为约 0.05wt%。抗氧化剂用以抑制浓缩卡诺拉分离蛋白溶液中存在的酚类物质的氧化。

[0072] 根据本发明,对浓缩和任选渗析的上清液进行热处理,以通过沉淀和除去 7S 蛋白质来减少溶液中存在的 7S 蛋白质的量,从而提高浓缩上清液中存在的卡诺拉蛋白质中 2S 蛋白质的比例。

[0073] 这种热处理可用温度和时间曲线来实现,所述温度和时间曲线足以降低浓缩上清液中存在的 7S 蛋白质的比例,优选极大程度地减少 7S 蛋白质的比例。一般来说,通过热处理,上清液的 7S 蛋白质含量减少至少约 50wt%,优选至少约 75wt%。一般来说,热处理可在约 70° 至约 100°C 的温度下,优选约 75 至约 95° 下进行约 2 至约 30 分钟,优选约 5 至约 15 分钟。沉淀出的 7S 蛋白质可通过任何便利方式,如离心或过滤而除去。

[0074] 除去降解的 7S 蛋白质(如通过离心)后的浓缩热处理上清液可通过任何便利技术,如喷雾干燥法或冷冻干燥法干燥成干品,以提供本发明的卡诺拉分离蛋白。这种新型卡诺拉分离蛋白的蛋白质含量高,超过约 90wt%蛋白质,优选至少约 100wt%蛋白质(以凯氏 N_x6.25 计算),且基本不发生变性(通过差示扫描量热法测定)。

[0075] 这种新型卡诺拉分离蛋白含有高比例的 2S 蛋白质,优选占卡诺拉分离蛋白的至少 90wt%,最优选至少约 95wt%。

[0076] 在生产新型卡诺拉分离蛋白的替代程序中,通过第一超滤步骤,将浸提卡诺拉油籽粕所生产出的蛋白质水溶液浓缩,以提高其中的蛋白质浓度,同时保持其离子强度基本不变,所述超滤步骤使用膜例如中空纤维膜或者螺旋错流膜,其分子量截留值足以使 7S 和 12S 蛋白质保留在截留液中,而让 2S 蛋白质通过膜。膜的合适分子量截留值为约 3,000 至

约 150,000 道尔顿, 优选约 5,000 至约 100,000 道尔顿。对于连续操作, 确定膜的尺寸, 以允许蛋白质水溶液透过膜时能够获得期望的浓缩程度。

[0077] 可实现所述第一超滤步骤, 以将蛋白质水溶液浓缩约 4 至约 20 倍, 蛋白质浓度达至少约 50g/L, 优选至少约 200g/L, 更优选至少约 250g/L。

[0078] 然后, 可使用体积摩尔浓度和 pH 与浸提溶液相同的盐水溶液, 使浓缩蛋白质溶液进行渗析步骤。在渗析步骤的至少一部分过程中, 在渗析介质中可存在抗氧化剂, 以抑制浓缩卡诺拉分离蛋白溶液中存在的酚类物质的氧化。所述抗氧化剂可以是任何合宜的抗氧化剂, 如亚硫酸钠或者抗坏血酸。渗析介质中采用的抗氧化剂的量取决于所采用的材料, 可在约 0.01 至约 1wt% 的范围变动, 优选为约 0.05wt%。

[0079] 渗析步骤可通过使用约 2 至约 20 体积的渗析溶液, 优选约 5 至约 10 体积的渗析溶液来进行。在渗析操作中, 2S 蛋白质、酚类物质和可见颜色成分连同其他低分子量成分一起随透过液通过膜, 从而从浓缩蛋白质溶液中除去。

[0080] 渗析步骤可用浓缩步骤所用的相同膜来进行。

[0081] 浓缩步骤和渗析步骤可在任何合宜的温度下进行, 通常为约 20°C 至约 60°C, 优选低于约 30°C, 进行的时间足以实现期望的浓缩和洗涤程度。所用的温度和其他条件在一定程度上取决于用以进行浓缩操作的膜设备和期望的溶液蛋白质浓度。

[0082] 第一超滤步骤中所用的膜允许相当比例的 2S 蛋白质连同其他低分子量物质一起通过而进入透过液中, 所述其他低分子量物质包括食品级盐的离子、碳水化合物、酚类物质、色素和抗营养因子。视不同的膜材质及形式而定, 通常选定膜的分子量截断值, 以保证相当比例的 7S 和 12S 蛋白质得以保留在截留液中, 同时又让 2S 蛋白质和污染物通过。

[0083] 然后可通过任何便利技术, 如喷雾干燥法或冷冻干燥法, 将浓缩步骤和任选渗析步骤所得的截留液干燥成干品。干燥蛋白的蛋白质含量高, 超过约 90wt% 蛋白质, 优选至少约 100wt% 蛋白质 ($N \times 6.25$), 且基本不发生变性 (通过差示扫描量热法测定)。所述干燥分离蛋白主要由卡诺拉 7S 蛋白质组成, 还含有一些 12S 蛋白质和可能少量的 2S 蛋白质。一般来说, 所述干燥卡诺拉分离蛋白含有:

[0084] 约 60 至约 95wt% 的 7S 蛋白质

[0085] 约 2 至约 15wt% 的 12S 蛋白质

[0086] 0 至约 30wt% 的 2S 蛋白质

[0087] 优选所述干燥卡诺拉分离蛋白含有:

[0088] 约 70 至约 90wt% 的 7S 蛋白质

[0089] 约 5 至约 10wt% 的 12S 蛋白质

[0090] 0 至约 20wt% 的 2S 蛋白质

[0091] 将浓缩步骤和任选渗析步骤所得的透过液在第二超滤步骤中浓缩, 使用膜例如中空纤维膜或者螺旋错流膜, 其具有合适的分子量截留值, 以保留 2S 蛋白质, 同时让低分子量物质 (包括盐、酚类物质、颜色成分和抗营养因子) 通过膜。视不同的膜材质及形式而定, 可使用分子量截留值为约 3,000 至约 30,000 道尔顿, 优选约 5,000 至约 10,000 道尔顿的超滤膜。透过液在干燥前通常先浓缩至蛋白质浓度为至少约 50g/L, 优选约 100 至约 400g/L, 更优选约 200 至约 300g/L。如上文对蛋白质溶液浓缩步骤所述, 这种浓缩操作可以以分批模式进行, 或者在连续操作中进行。

[0092] 可用水使浓缩透过液进行渗析步骤。在渗析步骤的至少一部分过程中,在渗析介质中可存在抗氧化剂,以抑制浓缩透过液中的酚类物质的氧化。所述抗氧化剂可以是任何合宜的抗氧化剂,如亚硫酸钠或者抗坏血酸。渗析介质中采用的抗氧化剂的量取决于所采用的材料,可在约 0.01 至约 1wt% 的范围变动,优选为约 0.05wt%。

[0093] 渗析步骤可通过使用 2 至 20 体积的渗析溶液,优选约 5 至约 10 体积的渗析溶液来进行。在渗析操作中,更多的污染物,包括酚类物质和可见颜色成分因通过渗析膜而从浓缩透过液中除去。渗析操作可进行至不能在透过液中除去更多的酚类物质和可见颜色成分为止。

[0094] 渗析步骤可用浓缩步骤所用的相同膜来进行。或者可使用单独的膜,视不同的膜材质及形式而定,所述膜的分子量截留值在约 3000 至约 50,000 道尔顿的范围,优选约 5,000 至约 10,000 道尔顿。

[0095] 可通过任何便利技术,如喷雾干燥法或冷冻干燥法,将浓缩和任选渗析过的透过液干燥成干品。干燥蛋白的蛋白质含量高,超过约 90wt% 蛋白质,优选至少约 100wt% 蛋白质 (Nx6.25),且基本不发生变性(通过差示扫描量热法测定)。所述干燥卡诺拉分离蛋白主要由卡诺拉 2S 蛋白质组成,还含有少量的 7S 蛋白质。一般来说,所述干燥卡诺拉分离蛋白含有:

[0096] 约 85 至约 100wt% 的 2S 蛋白质

[0097] 0 至约 15wt% 的 7S 蛋白质

[0098] 优选约 90 至约 100wt% 的 2S 蛋白质

[0099] 0 至约 10wt% 的 7S 蛋白质

[0100] 如果需要,可将一部分得自第一超滤步骤的浓缩卡诺拉分离蛋白与一部分得自第二超滤步骤的浓缩透过液合并,然后通过任何便利技术干燥合并的液流,以提供合并的卡诺拉分离蛋白组合物。可选定混合在一起的蛋白质类物质的相对比例,以提供具有所需的 2S/7S/12S 蛋白质分布的所得卡诺拉分离蛋白组合物。或者,可将干燥分离蛋白以任何所需比例合并,以在混合物中提供任何所需的特定 2S/7S/12S 蛋白质分布。合并的卡诺拉分离蛋白组合物其蛋白质含量高,超过约 90wt%,优选至少约 100wt% (以 Nx6.25 计算),且基本不发生变性(通过差示扫描量热法测定)。

[0101] 用这种方式操作,可将多种卡诺拉分离蛋白回收为不同比例的干燥混合物,以得自第一超滤的卡诺拉分离蛋白和得自第二超滤的卡诺拉分离蛋白的重量计,所述比例通常为约 5 : 95 至约 95 : 5 (重量),这对于根据组合物中不同比例的 2S/7S/12S 蛋白质获得不同的功能和营养性质来说是合乎需要的。

[0102] 优选实施方案的描述

[0103] 参照图 1,图中显示根据本发明的一个方面提供的新型二膜方法与通过胶束途径形成卡诺拉分离蛋白 (CPI) 的对比。

[0104] 图中可见,得自第一超滤阶段(超滤 #1,可包括超滤和渗析步骤)的截留液采取两种方式中的一种进行加工。在本发明的二膜方法中,将截留液喷雾干燥,以提供主要由 7S 卡诺拉蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白。

[0105] 在上述美国专利申请第 10/137,321 号的程序中,使截留液通过稀释步骤,在这当中卡诺拉分离蛋白沉淀为蛋白质胶束团。将所得蛋白质胶束团喷雾干燥,以提供主要由 7S

卡诺拉蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白。

[0106] 在本发明的二膜方法中,使得自第一超滤步骤的透过液进行第二超滤步骤(超滤 #2-A,可包括超滤和渗析)。将得自第二超滤步骤的截留液喷雾干燥,以提供主要由 2S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白。

[0107] 在 US 10/137,321 的方法中,将沉淀蛋白质胶束团所得的上清液进行超滤步骤(超滤 #2-B,可包括超滤和渗析)。将得自所述超滤步骤的截留液喷雾干燥,以提供主要由 2S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白。

[0108] 如上所述,可对得自后一超滤步骤的截留液进行热处理,以减少截留液中 7S 蛋白质的比例,提供本发明的新型卡诺拉分离蛋白。

实施例

[0109] 实施例 1:

[0110] 本实施例描述根据本发明一个实施方案的新型卡诺拉分离蛋白的生产。

[0111] 在环境温度下,将 ‘a’ kg 卡诺拉粕加入到 ‘b’ L 0.1M NaCl 溶液中,搅拌 30 分钟,以提供蛋白质水溶液。除去残余的卡诺拉粕,通过离心和过滤澄清所得蛋白质溶液,以提供 ‘c’ L 过滤的蛋白质溶液,其蛋白质含量为 ‘d’ % (重量)。

[0112] 将 ‘e’ L 的蛋白质浸提溶液等分试样通过在分子量截留值为 5,000 道尔顿的聚偏 1,1-二氟乙烯 (PVDF) 膜上浓缩,使其体积减少至 ‘f’ L,然后在相同的膜上用 ‘g’ L 0.1M NaCl 溶液进行渗析。接着将渗析的截留液在 60°C 下巴氏灭菌 10 分钟。所得巴氏灭菌过的浓缩蛋白质溶液的蛋白质含量为 ‘h’ % (重量)。

[0113] 在 ‘i’ °C 下,将浓缩溶液以 ‘j’ 比例稀释到温度为 ‘k’ °C 的冷 R0 水中。立即形成白色云状物,让其沉析。移出上层稀释用水,从沉析槽的底部回收沉淀、粘稠的粘性团块 (PMM),得率为过滤蛋白质溶液的 ‘l’ wt %。测出得自干燥 PMM 的蛋白质的蛋白质含量为 ‘m’ % (Nx6.25) d. b.。所得制品标示为 ‘n’ C300。

[0114] 两次试验的参数 ‘a’ 至 ‘n’ 在下表 I 中给出:

[0115] 表 I

[0116]

n	BW-SA034-J12-04A	BW-SA035-J14-04A
a	15	15
b	150	150
c	75	68
d	1.93	1.95
e	75	68

n	BW-SA034-J12-04A	BW-SA035-J14-04A
f	4	4
g	20	20
h	19.08	14.20
i	33	33
j	1 : 10	1 : 10
k	3	3
l	37.45	28.32
m	103.08	99.73

[0117] 用分子量截留值为 10,000 道尔顿的聚醚砜 (PES) 膜,通过超滤将移出的上清液的体积减少至 ‘o’ L,然后在相同的膜上用 ‘p’ L 水渗析浓缩液。接着将渗析的浓缩液在 60℃ 下巴氏灭菌 10 分钟。所得巴氏灭菌过的浓缩液含有 ‘q’ % (重量) 的蛋白质。加上从上清液回收的另外蛋白质,过滤蛋白质溶液的总蛋白质回收率为 ‘r’ wt%。将巴氏灭菌过的浓缩液分成两等份。其中一份进行喷雾干燥,形成最终制品,标示为 ‘n’ C200,其蛋白质含量为 ‘s’ % (Nx6.25) d. b. 。

[0118] 两次试验的参数 ‘n’ 至 ‘s’ 在下表 II 中给出 :

[0119] 表 II

[0120]

n	BW-SA034-J12-04A	BW-SA035-J14-04A
o	3.5	3
p	7	6
q	4.83	4.30
r	49.35	38.05
s	91.73	93.69

[0121] 另一份巴氏灭菌过的浓缩上清液加热至 85℃ 保持 10 分钟,然后离心除去沉淀的蛋白质。接着将所得浓缩液喷雾干燥,形成最终制品,标示为 ‘n’ C200H,其蛋白质含量为 ‘t’ % (Nx6.25)。两次试验的参数 ‘n’ 和 ‘t’ 在下表 III 中给出:

[0122] 表 III

[0123]

n	BW-SA034-J12-04A	BW-SA035-J14-04A
t	91.32	92.11

[0124] 实施例 2:

[0125] 本实施例显示加热温度和时间对从浓缩上清液生产出的卡诺拉分离蛋白的蛋白质分布的影响。

[0126] 如实施例 1 所述制备的批次 SA035-J14-04A 的 C200 卡诺拉分离蛋白用反渗透纯净水制备成溶液,其蛋白质浓度为 5wt%。所述溶液是通过在室温下用磁力搅拌棒将蛋白质和水一起搅拌 1 小时来制备的。

[0127] 将蛋白质溶液样品 (25ml) 装在离心管中于温控水浴中加热。将各样品在 75、80、85、90 或 95℃ 下的温度下加热 10 分钟。当样品的内部温度达到所需水平 $\pm 1^\circ\text{C}$ 内时开始计时,在整个加热过程中不断搅拌各样品。热处理后,将各样品 8,000g 离心 10 分钟,通过大小排阻 HPLC 分析上清液的蛋白质分布。

[0128] 所得结果在下表 IV 中给出:

[0129] 表 IV- 加热至不同温度的各 C200 溶液的蛋白质分布

[0130]

处理温度	% 7S	% 2S
对照(没有加热)	22.6	77.4
75℃	5.3	94.7
80℃	3.6	96.4
85℃	3.5	96.5
90℃	1.8	98.2
95℃	1.8	98.2

[0131] 从表 IV 中给出的结果可见,所施加的所有热处理导致样品中 7S 蛋白质显著减少。在 90℃ 下处理导致 7S 水平最低,将温度提高到 95℃ 并没有更多的降低。经大小排阻 HPLC 分析确定,热处理对 2S 的峰面积几乎没有影响。这意味着热处理导致 2S 蛋白质损失最低。

[0132] 将蛋白质溶液样品 (80ml) 在与温度设定为 90℃ 的循环水浴连接的夹层容器中加热,用磁力搅拌棒混合样品。在加热时间为 5、10 和 15 分钟时移取加热溶液的等分试样。当测出样品的温度为 85℃ 时开始计时。热处理后,将收集的各样品在 8,000g 下离心 10 分钟,上清液提交分析。

[0133] 所得结果在下表 V 中给出:

[0134] 表 V- 加热不同时间长度的各 C200 溶液的蛋白质分布

[0135]

处理时间	% 7S	% 2S
对照(没有加热)	22.6	77.4
5 min	1.8	98.2
10 min	1.9	98.1
15 min	1.9	98.1

[0136] 从表 V 中给出的结果可见,任何测试时间的样品中 7S 蛋白质水平没有显著性差异。

[0137] 从本实施例得出的结果明显可见,可采用多种加热条件,实现浓缩上清液中 7S 蛋白质水平的显著下降。

[0138] 实施例 3:

[0139] 本实施例对根据实施例 1 生产的卡诺拉分离蛋白的蛋白质分布进行评估。

[0140] 用大小排阻 HPLC 评估根据实施例 1 的程序生产的浓缩上清液和改良浓缩上清液的蛋白质分布。喷雾干燥制品在进行 HPLC 分析前先以 1wt% 的水平溶于 0.1M NaCl 中。

[0141] 所得结果在下表 VI 中给出:

[0142] 表 VI

[0143]

批次	制品	% 12S	% 7S	% 2S
SA034-J12-04A	浓缩上清液 (C200)	0.00	13.13	86.67
	改良浓缩上清液 (C200H)	0.00	3.55	96.45
SA035-J14-04A	浓缩上清液 (C200)	0.00	24.52	75.48
	改良浓缩上清液 (C200H)	0.00	7.55	92.45

[0144] 从表 VI 中给出的结果可见,与没有进行这种热处理相比,浓缩上清液的热处理导致喷雾干燥的卡诺拉分离蛋白中 7S 蛋白质的量显著减少。

[0145] 实施例 4:

[0146] 本实施例对实施例 1 生产出的卡诺拉分离蛋白的溶解度进行评估。

[0147] 按实施例 1 程序生产出的喷雾干燥浓缩上清液 (C200) 和改良浓缩上清液 (C200H) 的溶解度,用 Morr 等, J. Food Sci. 50:1715-1718 的方法的修改版本进行测定。

[0148] 将足够提供 0.5g 蛋白质的蛋白质粉末称至烧杯中,然后加入少量的反渗透 (RO) 纯净水,将所得混合物搅拌至形成均匀糊状物。然后再加入水,使体积达到约 45ml。接着用磁力搅拌器慢慢搅拌烧杯中的内容物 60 分钟。在蛋白质分散后立即测定 pH,并用 NaOH 或 HCl 将 pH 调至适当水平 (4、5、6 或 7)。同时制备自然 pH 下的样品。对于进行过 pH 调节

的样品,在 60 分钟搅拌过程中测量和校正 pH 两次。搅拌 60 分钟后,用 R0 水将各样品定容至 50ml 的总体积,得 1% w/v 的蛋白质分散液。保留蛋白质分散液的等分试样,供用 Leco FA28 定氮仪通过 Leco 分析测定蛋白质含量。将另一部分样品在 8000g 下离心 10 分钟。这沉淀出任何不溶物质,得到澄清的上清液。然后通过 Leco 分析测定上清液的蛋白质含量。

[0149] 溶解度(%) = (上清液蛋白质浓度 / 原始分散液蛋白质浓度) × 100

[0150] 所得结果在下表 VII 中给出:

[0151] 表 VII

[0152]

批次	制品	溶解度(%)				
		pH4	pH5	pH6	pH7	自然 pH
SA034-J12-04A	浓缩上清液	88.1	100	86.1	97.3	89.8
	改良浓缩上清液	100	100	100	100	100
SA035-J14-04A	浓缩上清液	87.4	95	90.6	90.6	86.7
	改良浓缩上清液	100	100	100	100	100

[0153] 从表 VII 中给出的结果可见,比起得自浓缩上清液 (C200) 的干燥分离蛋白,得自改良浓缩上清液 (C200H) 的干燥分离蛋白在各种 pH 值下明显地更溶于水。

[0154] 实施例 5:

[0155] 本实施例对实施例 1 生产出的卡诺拉分离蛋白在软饮料中的溶解度进行评估。

[0156] 按实施例 1 程序生产出的喷雾干燥浓缩上清液和改良浓缩上清液在软饮料中的溶解度,用 Morr 等, J. Food Sci. 50:1715-1718 的方法的修改版本进行测定。

[0157] 将足够提供 1.0g 蛋白质的蛋白质粉末称至烧杯中,然后加入少量无色透明的市售充碳酸气软饮料,将所得混合物搅拌至形成均匀糊状物。然后再加入水,使体积达到约 45ml。接着用磁力搅拌器慢慢搅拌烧杯中的内容物 60 分钟。搅拌 60 分钟后,用软饮料将各样品定容至 50ml 的总体积,得 2% w/v 的蛋白质分散液。保留蛋白质分散液的等分试样,供通过 Leco 分析测定蛋白质含量。将另一部分样品在 8000g 下离心 10 分钟。这沉淀出任何不溶物质,得到澄清的上清液。然后通过 Leco 分析测定上清液的蛋白质含量。

[0158] 溶解度(%) = (上清液蛋白质浓度 / 原始分散液蛋白质浓度) × 100

[0159] 所得结果在下表 VIII 中给出:

[0160] 表 VIII

[0161]

批次	制品	溶解度(%)
SA034-J12-04A	浓缩上清液	92.3
	改良浓缩上清液	94.9

批次	制品	溶解度 (%)
SA035-J14-04A	浓缩上清液	96.1
	改良浓缩上清液	94.4

[0162] 从表 VIII 中给出的结果可见,得自改良浓缩上清液 (C200H) 和浓缩上清液 (C200) 的干燥分离蛋白在软饮料中具有近似的溶解度。

[0163] 但是,从以下实施例 6 的结果可见,从得自改良浓缩上清液的干燥分离蛋白制备的溶液其澄清度更为优越。

[0164] 实施例 6 :

[0165] 本实施例评估实施例 1 生产出的喷雾干燥分离蛋白溶于软饮料中所得溶液的澄清度。

[0166] 对得自如实施例 1 所述生产出的改良浓缩上清液和浓缩上清液的喷雾干燥分离蛋白在软饮料中所成溶液的澄清度进行测定。所述澄清度是通过测量 2% w/v 蛋白质在无色透明的市售充碳酸气软饮料中的溶液对 600nm 可见光的吸光度来评估的。吸光度读数越低,光线透过得越好,溶液的澄清度也越好。

[0167] 所得结果在下表 IX 中给出 :

[0168] 表 IX

[0169]

批次	制品	A600
SA034-J12-04A	浓缩上清液	0.544
	改良浓缩上清液	0.150
SA035-J14-04A	浓缩上清液	1.920
	改良浓缩上清液	0.367

[0170] 从表 IX 中给出的结果可见,从得自改良浓缩上清液 (C200H) 的喷雾干燥分离蛋白制备的溶液,其澄清度比从得自浓缩上清液 (C200) 的喷雾干燥分离蛋白制备的溶液要优越得多。

[0171] 实施例 7 :

[0172] 本实施例说明用以形成本发明新型卡诺拉分离蛋白的替代性方法 (图 1)。

[0173] 在环境温度下,在 350L 浸提罐中将 15kg 卡诺拉油籽粕加入到含 0.05wt% 抗坏血酸的 100L (15% w/v) 0.15M 氯化钠溶液中,将所得混合物搅拌 30 分钟,以提供浓度为 20g/L 的卡诺拉蛋白质溶液。用带 400 目袋的篮式离心机除去大体积残余粕,分离出的大体积粕作废物弃去。用 600 目袋使卡诺拉蛋白质溶液再次通过篮式离心机除去悬浮的细微颗粒。所得卡诺拉蛋白质溶液用带 2 μ m 过滤垫的压滤机进行最终过滤。

[0174] 在环境温度下,用分子量截留值为 100,000 道尔顿的螺旋错流聚偏 1,1-二氟乙烯(PVDF)膜使澄清的卡诺拉蛋白质溶液进行超滤步骤,以将含 7S 和 12S 蛋白质的卡诺拉蛋白质溶液浓缩至体积为 4.3L,蛋白质浓度为 188g/L。超滤步骤的透过液含有 2S 蛋白质以及其他低分子量物质。

[0175] 然后用超滤所用的相同膜,用含 0.05wt% 抗坏血酸的 0.15M 氯化钠水溶液,使浓缩的卡诺拉蛋白质溶液(截留液)进行渗析步骤。渗析介质加入到截留液中的流速和透过液从膜中除去的流速相同。用 5 倍截留液体积的渗析介质进行渗析。

[0176] 将超滤和渗析操作所得的截留液取 1.25L 等分试样进行喷雾干燥,以提供主要由 7S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白,其蛋白质含量为 99.1wt% (Nx6.25,氮的百分含量用 Leco FP528 定氮仪来测定)d.b.,含有 18.21wt% 的 2S 蛋白质,74.55wt% 的 7S 蛋白质和 7.24wt% 的 12S 蛋白质。

[0177] 用分子量截留值为 5000 道尔顿的螺旋错流聚醚砜(PES)膜,将超滤和渗析操作所得的透过液进行超滤步骤,以让 2S 蛋白质保留下来,让低分子量污染物通过膜成为废物。在环境温度下进行这个超滤步骤,以将第一超滤步骤所得的含 2S 透过液浓缩至 3L,蛋白质浓度为 125g/L。

[0178] 然后用超滤所用的相同膜和用过滤的自来水作为渗析介质,使浓缩的卡诺拉 2S 蛋白质溶液(截留液)进行渗析步骤。水加入到截留液中的流速和透过液从膜中除去的流速相同。用 5 倍截留液体积的渗析介质进行渗析。

[0179] 将渗析步骤所得的截留液进行喷雾干燥,以提供主要由 2S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白,其蛋白质含量为 105.8wt% (Nx6.25)d.b.,含有 96.7wt% 的 2S 蛋白质,3.3wt% 的 7S 蛋白质和 0.04wt% 的 12S 蛋白质。

[0180] 实施例 8 :

[0181] 本实施例是实施例 7 的方法的重复,但规模更大。

[0182] 在环境温度下,在 10,000L 浸提罐中将 150kg 卡诺拉油籽粕加入到含 0.05wt% 抗坏血酸的 1000L(15% w/v)0.15M 氯化钠溶液中,将所得混合物搅拌 30 分钟,以提供浓度为 20.7g/L 的卡诺拉蛋白质溶液。用真空过滤带除去大体积残余粕,分离出的粕作废物弃去。用碟式离心机澄清卡诺拉蛋白质溶液,清除出的固形物作废物弃去。所得卡诺拉蛋白质溶液用带 2 μ m 过滤垫的压滤机和接着用带 0.2 μ m 过滤垫的另一压滤机进行最终过滤。

[0183] 用两张分子量截留值为 100,000 道尔顿的螺旋错流 PVDF 膜使澄清的卡诺拉蛋白质溶液进行超滤步骤,以将含 7S 和 12S 蛋白质的卡诺拉蛋白质溶液浓缩至体积为 41.1L,蛋白质浓度为 221g/L。超滤步骤出来的透过液含有 2S 蛋白质以及其他低分子量物质。

[0184] 将超滤操作所得的截留液取 3L 等分试样进行喷雾干燥,以提供主要由 7S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白,其蛋白质含量为 95.1wt% (Nx6.25)d.b.,含有 26.86wt% 的 2S 蛋白质,66.22wt% 的 7S 蛋白质和 6.92wt% 的 12S 蛋白质。

[0185] 用两张分子量截留值为 5,000 道尔顿的螺旋错流 PVDF 膜,将超滤操作所得的透过液进行超滤步骤,以让 2S 蛋白质保留下来,让低分子量污染物通过膜成为废物。在环境温度下进行这个超滤步骤,以将第一超滤步骤所得的含 2S 透过液浓缩至 25L,蛋白质浓度为 24.2g/L。

[0186] 将超滤步骤所得的截留液进行喷雾干燥,以形成非渗析的卡诺拉蛋白质制品,其

蛋白质浓度为 47.94wt% (Nx6.25)d. b., 含有 94.64wt% 的 2S 蛋白质, 5.36wt% 的 7S 蛋白质和 0wt% 的 12S 蛋白质。

[0187] 后一卡诺拉蛋白质制品蛋白质含量低是因为没有进行渗析步骤以除去盐和其他杂质。此制品后来的台式渗析得出的结果说明卡诺拉分离蛋白的生产需要经过渗析。

[0188] 实施例 9 :

[0189] 本实施例提供根据实施例 7 程序制备的卡诺拉分离蛋白制品与通过胶束途径制备的卡诺拉分离蛋白制品的比较。

[0190] 将得自实施例 7 所述第一超滤步骤的截留液的 34L 整分试样升温至 29.8°C, 并以每体积截留液 10 体积水的比例倒入温度为 3.7°C 的冷水中。立即形成蛋白质胶束白色云状物。让胶束聚结沉析过夜。使积聚的蛋白质胶束团与上清液分离并喷雾干燥, 以提供蛋白质含量为 107.4wt% (Nx6.25)d. b. 的卡诺拉分离蛋白, 其含有 3.80wt% 的 2S 蛋白质, 85.88wt% 的 7S 蛋白质和 10.32wt% 的 12S 蛋白质。

[0191] 用分子量截留值为 5000 道尔顿的螺旋错流 PVDF 膜, 使得自 PMM 沉析步骤的上清液 (365L) 进行超滤步骤, 让 2S 蛋白质和 7S 蛋白质保留下来, 而让低分子量污染物通过膜成为废物。在环境温度下进行这个超滤步骤, 以将上清液浓缩至 22L, 蛋白质含量为 89.3g/L。

[0192] 将浓缩上清液喷雾干燥, 以提供主要由 2S 蛋白质组成的卡诺拉分离蛋白, 其蛋白质含量为 95.51wt% (Nx6.25)d. b., 含有 84.01wt% 的 2S 蛋白质, 15.51wt% 的 7S 蛋白质和 0.48wt% 的 12S 蛋白质。

[0193] 本公开内容的总结

[0194] 现总结本公开内容如下, 本发明提供了 2S 蛋白质含量提高, 7S 蛋白质含量减少的新型卡诺拉分离蛋白, 所述新型卡诺拉分离蛋白在生产澄清水溶液特别是软饮料中有用。在本发明的范围内可能有各种修改方案。

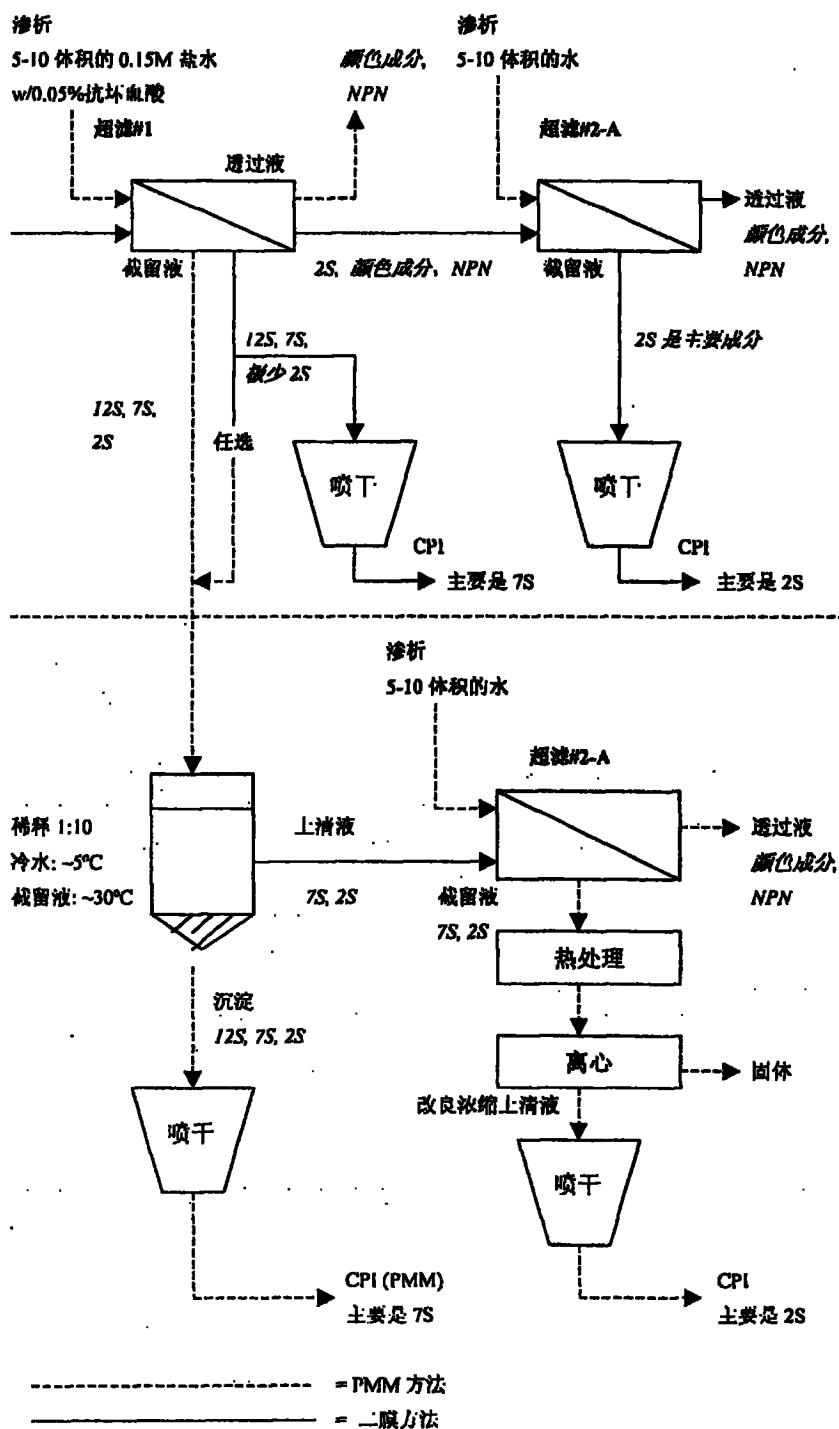


图 1