

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-518409

(P2007-518409A)

(43) 公表日 平成19年7月12日(2007.7.12)

(51) Int. Cl.

A23J 3/14 (2006.01)
A23J 1/14 (2006.01)

F I

A23J 3/14
A23J 1/14

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2006-549806 (P2006-549806)
(86) (22) 出願日 平成17年1月20日 (2005.1.20)
(85) 翻訳文提出日 平成18年9月20日 (2006.9.20)
(86) 国際出願番号 PCT/CA2005/000062
(87) 国際公開番号 W02005/067729
(87) 国際公開日 平成17年7月28日 (2005.7.28)
(31) 優先権主張番号 60/537,031
(32) 優先日 平成16年1月20日 (2004.1.20)
(33) 優先権主張国 米国 (US)

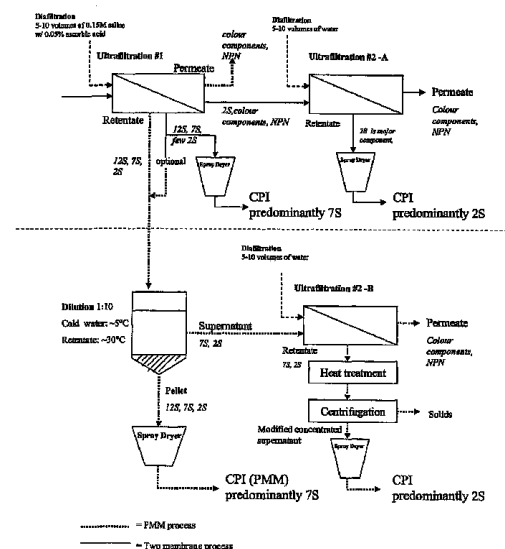
(71) 出願人 503403869
バーコン ニュートラサイエンス (エム
ビー) コーポレーション
BURCON NUTRASCIENCE
(MB) CORP.
カナダ国 アール3ティー 1ピー9 マ
ニトバ ウィニペグ ウォーラー アヴェ
ニュー 1388
(74) 代理人 100123788
弁理士 宮崎 昭夫
(74) 代理人 100106138
弁理士 石橋 政幸
(74) 代理人 100127454
弁理士 緒方 雅昭

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なキャノーラタンパク質単離物

(57) 【要約】

大部分が2Sキャノーラタンパク質からなり、溶解特性が改善されている新規なキャノーラタンパク質単離物は、2Sキャノーラタンパク質の割合が増大しており、かつ7Sキャノーラタンパク質の割合が減少している。新規なキャノーラタンパク質単離物は、キャノーラタンパク質のミセルの生成および沈殿による上澄み水溶液の加熱処理によって生成させて、7Sタンパク質の沈殿をもたらす、この7Sタンパクを沈降させ除去する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

大部分が 2 S キャノーラタンパク質からなり、かつキャノーラタンパク質のミセルの生成および沈殿によって上澄み水溶液から得られたキャノーラタンパク質単離物と比較して、乾燥重量ベース (d . b .) (N × 6 . 2 5) で少なくとも約 9 0 重量 % のタンパク質含量を有し、2 S キャノーラタンパク質の割合が増大しており、かつ 7 S キャノーラタンパク質の割合が減少している、大部分が 2 S キャノーラタンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物。

【請求項 2】

前記上澄み水溶液を加熱処理して得られる請求項 1 に記載のキャノーラタンパク質単離物。 10

【請求項 3】

キャノーラ油糧種子粗粉から得られ、かつ 1 2 S、7 S および 2 S キャノーラタンパク質を含むキャノーラタンパク質水溶液に、1 2 S および 7 S キャノーラタンパク質を選択的に残留液中に保持し 2 S タンパク質を透過液として膜を通過させる第 1 の選択的膜技術を施し、前記透過液に、2 S キャノーラタンパク質を選択的に保持し低分子量汚染物質を透過液として膜を通過させる第 2 の選択的膜技術を施し、第 2 の選択的膜技術による前記残留液を乾燥させる選択的膜手順から得られる請求項 1 に記載のキャノーラタンパク質単離物。

【請求項 4】

少なくとも約 1 0 0 重量 % (N × 6 . 2 5) d . b . のタンパク質含量を有する請求項 1 に記載のキャノーラタンパク質単離物。 20

【請求項 5】

乾燥重量ベース (d . b .) で少なくとも約 9 0 重量 % (N × 6 . 2 5) のタンパク質含量を有し、単離物中に存在するキャノーラタンパク質の少なくとも約 8 5 重量 % の 2 S キャノーラタンパク質と約 1 5 重量 % 未満の 7 S キャノーラタンパク質を含むキャノーラタンパク質単離物。

【請求項 6】

単離物中に存在するキャノーラタンパク質の少なくとも約 9 0 重量 % の 2 S キャノーラタンパク質と約 1 0 重量 % 未満の 7 S キャノーラタンパク質を含む請求項 5 に記載のキャノーラタンパク質単離物。 30

【請求項 7】

少なくとも約 1 0 0 重量 % (N × 6 . 2 5) d . b . のタンパク質含量を有する請求項 5 に記載のキャノーラタンパク質単離物。

【請求項 8】

2 S キャノーラタンパク質の割合が増大しているキャノーラタンパク質単離物の調製方法であって、

(a) 大部分が 2 S タンパク質からなる、2 S タンパク質および 7 S タンパク質の水溶液を用意するステップと、

(b) 前記水溶液を加熱処理して 7 S キャノーラタンパク質の沈殿するステップと、 40

(c) 前記水溶液から沈殿した 7 S タンパク質を除去するステップと、

(d) 少なくとも約 9 0 重量 % (N × 6 . 2 5) d . b . のタンパク質含量を有し、2 S キャノーラタンパク質の割合が増大しているキャノーラタンパク質単離物を回収するステップと

を含む方法。

【請求項 9】

前記加熱処理ステップを、前記水溶液中に存在する 7 S キャノーラタンパク質の少なくとも約 5 0 重量 % を沈殿するのに十分な温度と時間の条件下で実施する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記加熱処理ステップが、前記 7 S キャノーラタンパク質を、前記水溶液中に存在する 7 S キャノーラタンパク質の少なくとも 75 % 沈殿する請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記加熱処理ステップを、約 75 ~ 約 95 の温度で約 5 ~ 約 15 分間、水溶液を加熱することによって実施する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 12】

2 S および 7 S キャノーラタンパク質の前記水溶液が、キャノーラタンパク質のミセルの生成および沈殿によって濃縮された上澄み液である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記キャノーラタンパク質ミセルの生成を、

10

(a) キャノーラ油糧種子粗粉を少なくとも約 5 の温度で抽出し、前記キャノーラ油糧種子粗粉中のタンパク質を可溶化してタンパク質水溶液を形成するステップと、

(b) 前記タンパク質水溶液を残留油糧種子粗粉から分離するステップと、

(c) 前記タンパク質水溶液の濃度を少なくとも約 200 g / L に増大させ、同時に、選択的膜技術によってイオン強度を実質的に一定に保持して濃縮タンパク質溶液を提供するステップと、

(d) 前記濃縮タンパク質溶液を約 15 未満の温度の冷水中に入れて希釈してタンパク質ミセルを生成させるステップと、

(e) 沈降したタンパク質ミセルの集団から上澄み液を分離するステップと

によって実施する請求項 12 に記載の方法。

20

【請求項 14】

前記加熱処理の前に、前記上澄み液を約 100 ~ 約 400 g / L のタンパク質濃度まで濃縮する請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記上澄み液を約 200 ~ 約 300 g / L のタンパク質濃度まで濃縮する請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記濃縮ステップを、分子量カットオフ約 3,000 ~ 約 100,000 ダルトンを有する膜を用いた限外濾過によって実施する請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

30

前記加熱処理ステップの前に、限外濾過により得られた濃縮上澄み液をダイアフィルトレーションにかける請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

約 3,000 ~ 約 100,000 ダルトンの分子量カットオフを有する膜を使用して、前記ダイアフィルトレーションステップを、約 2 ~ 約 20 容、好ましくは約 5 ~ 約 10 容の水を用いて実施する請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記キャノーラタンパク質単離物が少なくとも約 100 重量% (N x 6.25) d.b. のタンパク質含量を有する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 20】

40

キャノーラタンパク質単離物の調製方法であって、

(a) キャノーラ油糧種子粗粉から得られ、12 S、7 S および 2 S キャノーラタンパク質を含むキャノーラタンパク質水溶液を用意するステップと、

(b) 7 S および 12 S キャノーラタンパク質を残留液中に保持し 2 S タンパク質を透過液として膜通過させて、濃縮タンパク質溶液を提供するのに効果的な選択的な膜技術を用いて水溶液のタンパク質濃度を増大させるステップと、

(c) ステップ (b) からの残留液を乾燥させて、大部分が 7 S キャノーラタンパク質からなり、乾燥重量ベース (d.b.) で少なくとも約 90 重量% (N x 6.25) のタンパク質含量を有するキャノーラタンパク質単離物を提供するステップと、

(d) 2 S キャノーラタンパク質を残留液中に保持し、低分子量汚染物質を膜を通して透

50

過液中で通過させるのに効果的な選択的膜技術を用いてステップ (a) からの透過液の濃度を増大させるステップと、

(e) ステップ (d) からの残留液を乾燥して、大部分が 2 S タンパク質からなり、少なくとも約 90 重量 % (N x 6 . 25) d . b . のタンパク質含量を有するキャノーラタンパク質単離物を提供するステップと

を含む方法。

【請求項 2 1】

前記キャノーラタンパク質水溶液を、少なくとも約 5 の温度でキャノーラ油糧種子粗粉を抽出し、前記キャノーラ油糧種子粗粉中のタンパク質を可溶化して、約 5 ~ 約 40 g / L のタンパク質含量と約 5 ~ 約 6 . 8 の pH を有するタンパク質水溶液を生成するステップと、残留油糧種子粗粉から該タンパク質水溶液を分離するステップとによって提供する請求項 2 0 に記載の方法。

10

【請求項 2 2】

ステップ (b) を、前記水溶液を少なくとも約 200 g / L のタンパク質含量に濃縮し、同時に、約 30 , 000 ~ 約 150 , 000 ダルトン、好ましくは約 50 , 000 ~ 約 100 , 000 ダルトンの分子量カットオフを有する限外濾過膜を用いて、イオン強度を実質的に一定に保持することによって実施して濃縮タンパク質溶液を提供する請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記濃縮タンパク質溶液を、約 2 ~ 約 20、好ましくは約 5 ~ 約 10 容のダイアフィルトレーション溶液を用いたダイアフィルトレーションのステップにかける請求項 2 2 に記載の方法。

20

【請求項 2 4】

ステップ (d) を、約 3 , 000 ~ 約 30 , 000 ダルトン、好ましくは約 5 , 000 ~ 約 10 , 000 ダルトンの分子量カットオフを有する膜を用いて、透過液の濃度を約 100 ~ 約 400 g / L、好ましくは約 200 ~ 約 300 g / L のタンパク質濃度に増大させることによって実施して残留液を提供する請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記残留液を、約 2 ~ 約 20、好ましくは約 5 ~ 約 10 容のダイアフィルトレーション溶液を用いたダイアフィルトレーションのステップにかける請求項 2 4 に記載の方法。

30

【請求項 2 6】

ステップ (c) および (e) で作製されたキャノーラタンパク質単離物の少なくとも 1 つが少なくとも約 100 重量 % のタンパク質含量を有する請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 7】

請求項 1 に記載のキャノーラタンパク質単離物の水溶液。

【請求項 2 8】

キャノーラタンパク質単離物で強化したソフトドリンクである請求項 2 7 に記載の水溶液。

【請求項 2 9】

請求項 5 に記載のキャノーラタンパク質単離物の水溶液。

40

【請求項 3 0】

キャノーラタンパク質単離物で強化したソフトドリンクである請求項 2 9 に記載の水溶液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明はキャノーラタンパク質単離物の製造に関する。

【0002】

(発明の背景)

50

少なくとも100重量%(N×6.25)のタンパク質含量を有するキャノーラ油糧種子タンパク質単離物は、本譲受人に譲渡されている同時係属の2002年5月3日出願の米国特許出願第10/137,391号(WO02/089597)(その開示を参照により本明細書に組み込む)に記載の方法によって油糧種子粗粉から生成させることができる。この手順は、塩溶液を用いてキャノーラ油糧種子粗粉を抽出するステップと、得られたタンパク質水溶液を残留油糧種子粗粉から分離するステップと、選択的膜技術を用いて、水溶液のタンパク質濃度を少なくとも約200g/Lに増大させ、同時に、イオン強度を実質的に一定に保持するステップと、得られた濃縮タンパク質溶液を冷水中に希釈してタンパク質ミセルの生成をもたらすステップと、タンパク質のミセルを沈降させて無定形の、付着性のある、ゼラチン状のグルテン様タンパク質ミセル塊(PMM)を形成させるステップと、少なくとも約100重量%(N×6.25)を有するタンパク質含量を有する上澄み液からタンパク質ミセルの集団を回収するステップとを含む複数のステップのプロセスを含む。本明細書で用いるタンパク質含量は乾燥重量ベースで測定したものである。回収したPMMは乾燥することができる。

10

【0003】

本方法の一実施形態では、PMM沈降ステップからの上澄み液を処理してキャノーラタンパク質単離物を上澄み液から回収する。この手順は、最初に限外濾過膜を用いて上澄み液を濃縮し、濃縮物を乾燥することによって行うことができる。得られるキャノーラタンパク質単離物は少なくとも約90重量%、好ましくは少なくとも約100重量%(N×6.25)のタンパク質含量を有する。

20

【0004】

米国特許出願第10/137,391号に記載の手順は基本的には回分方式による手順である。本譲受人に譲渡されている同時係属の2002年11月19日出願の米国特許出願第10/298,678号(WO03/043439)(その開示を参照により本明細書に組み込む)では、キャノーラタンパク質単離物を作製するための連続プロセスが記載されている。これによると、キャノーラ油糧種子粗粉を塩溶液と連続的に混合し、その混合物をパイプを通して輸送し、その間にキャノーラ油糧種子粗粉からタンパク質を抽出してタンパク質水溶液を生成させ、そのタンパク質水溶液を選択的膜操作によって連続的に輸送して、イオン強度を実質的に一定に保持しながらタンパク質水溶液のタンパク質含量を少なくとも約50g/Lに増大させ、得られた濃縮タンパク質溶液を冷水と連続的に混合してタンパク質ミセルの生成をもたらす、そのタンパク質ミセルを連続的に沈降させ、同時に、沈降容器に所望の量のPMMが蓄積されるまで、上澄み液を連続的にオーバーフローさせる。沈降容器からPMMを回収し、これを乾燥することができる。PMMは少なくとも約90重量%(N×6.25)、好ましくは少なくとも約100重量%のタンパク質含量を有する。オーバーフローした上澄み液を処理して、上記のように、それからキャノーラタンパク質単離物を回収することができる。

30

【0005】

キャノーラ種子は約10~約30重量%のタンパク質を含むことが知られており、いくつかの異なるタンパク質成分が特定されている。これらのタンパク質には、クルシフェリンとして知られている12Sグロブリン、7Sタンパク質およびナピンとして知られている2S貯蔵タンパク質が含まれる。本譲受人に譲渡されている同時係属の2003年4月15日出願の米国特許出願第10/413,371号(WO03/088760)(その開示を参照により本明細書に組み込む)に記載のように、濃縮タンパク質水溶液を希釈してPMMを生成し、上澄み液を処理して追加のタンパク質を回収することを含む上記手順によって、異なるタンパク質プロファイルの単離物の回収がもたらされる。

40

【0006】

この関連で、PMM誘導のキャノーラタンパク質単離物は、約60~約98重量%の7Sタンパク質、約1~約15重量%の12Sタンパク質および0~約25重量%の2Sタンパク質からなるタンパク質成分含量を有する。上澄み液誘導のキャノーラタンパク質単離物は、約60~約95重量%の2Sタンパク質、約5~約40重量%の7Sタンパク質

50

および 0 ~ 約 5 重量 % の 1 2 S タンパク質からなるタンパク質成分含量を有する。したがって、PMM 誘導のキャノーラタンパク質単離物は大部分 7 S タンパク質であり、上澄み液誘導のキャノーラタンパク質単離物は大部分が 2 S タンパク質である。上記米国特許出願第 1 0 / 4 1 3 , 3 7 1 号に記載のように、2 S タンパク質は約 1 4 , 0 0 0 ダルトンの分子サイズを有し、7 S タンパク質は約 1 4 5 , 0 0 0 ダルトンの分子質量を有し、1 2 S タンパク質は約 2 9 0 , 0 0 0 ダルトンの分子サイズを有する。

【 0 0 0 7 】

キャノーラは菜種または菜種油としても知られている。

【 0 0 0 8 】

(発明の概要)

驚くべきことに、2 S タンパク質の割合が増大している、好ましくは少なくとも約 8 5 重量 % の 2 S タンパク質を含み、7 S タンパク質の割合が減少している新規なキャノーラタンパク質単離物は、上記米国特許出願第 1 0 / 1 3 7 , 3 9 1 号の手順にしたがって調製された上澄み液誘導のキャノーラタンパク質単離物に対して、水溶液中で優れた特性を示すことがわかった。

【 0 0 0 9 】

様々な pH 値で溶解性が改善されていることに加えて、本明細書で提供する新規なキャノーラタンパク質単離物は、ソフトドリンクに溶液透明度の向上をもたらすことができ、透明なタンパク質を強化したソフトドリンクを提供することができる。

【 0 0 1 0 】

したがって、本発明の一態様では、大部分が 2 S キャノーラタンパク質からなり、かつキャノーラタンパク質のミセルの生成および沈殿による上澄み水溶液から得られるキャノーラタンパク質単離物と比較して、乾燥重量ベース (d . b .) で少なくとも約 9 0 重量 % (N x 6 . 2 5) のタンパク質含量を有し、2 S キャノーラタンパク質の割合が増大しており、7 S キャノーラタンパク質の割合が減少している大部分が 2 S キャノーラタンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を提供する。

【 0 0 1 1 】

本発明の別の態様では、乾燥重量ベース (d . b .) で少なくとも約 9 0 重量 % (N x 6 . 2 5) のタンパク質含量を有し、単離物中に存在するキャノーラタンパク質の少なくとも約 8 5 重量 % の 2 S キャノーラタンパク質および約 1 5 重量 % 未満の 7 S キャノーラタンパク質を含むキャノーラタンパク質単離物を提供する。

【 0 0 1 2 】

濃縮された上澄み液中の 7 S タンパク質の割合を低減させ、したがって 2 S タンパク質の割合を増大させるために、新規なキャノーラタンパク質単離物を、米国特許出願第 1 0 / 1 3 7 , 3 9 1 号の手順による、濃縮された上澄み液の熱処理によって調製することができる。したがって本発明の別の態様では、2 S キャノーラタンパク質の割合が増大しているキャノーラタンパク質単離物の調製方法であって、(a) 大部分が 2 S タンパク質からなる 2 S タンパク質および 7 S タンパク質の水溶液を用意するステップと、(b) 上記水溶液を加熱処理して 7 S キャノーラタンパク質の沈殿をもたらすステップと、(c) 上記水溶液から沈殿した 7 S タンパク質を沈殿するステップと、(d) 少なくとも約 9 0 重量 % (N x 6 . 2 5) d . b . のタンパク質含量を有し、2 S キャノーラタンパク質の割合が増大しているキャノーラタンパク質単離物を回収するステップとを含む方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

あるいは、新規なキャノーラタンパク質単離物は、キャノーラ油糧種子粗粉からのタンパク質の抽出に続いて、そのタンパク質溶液を、2 S タンパク質を膜を通して透過液で通過させ、同時に 7 S および 1 2 S タンパク質を残留液中に保持する分子量カットオフを有する膜での第 1 の選択的膜ステップにかける手順によって調製することができる。次いで、残留液を乾燥して、大部分が 7 S タンパク質である第 1 のキャノーラタンパク質単離物を提供する。次いで、第 1 の選択的膜プロセスのステップからの透過液を、2 S タンパク

10

20

30

40

50

質を保持し、塩、フェノール類および抗栄養物質を含む低分子量汚染物質を通過させる分子量カットオフを有する膜での第2の選択的膜ステップにかける。次いで後者の選択的膜ステップからの残留液を乾燥して大部分が2Sタンパク質であり、新規なタンパク質単離物である第2のキャノーラタンパク質単離物を提供する。

【0014】

したがって、本発明の追加の態様では、キャノーラタンパク質単離物の調製方法であって、(a)キャノーラ油糧種子粗粉から得られ、12S、7Sおよび2Sキャノーラタンパク質を含むキャノーラタンパク質水溶液を用意するステップと、(b)7Sおよび12Sキャノーラタンパク質を残留液中に保持し、2Sタンパク質を透過液として膜通過させるのに効果的な選択的膜技術を用いて水溶液のタンパク質濃度を増大させて、濃縮タンパク質溶液を提供するステップと、(c)ステップ(b)からの残留液を乾燥させて、大部分が7Sキャノーラタンパク質からなり、乾燥重量ベース(d.b.)で少なくとも約90重量%(N×6.25)のタンパク質含量を有するキャノーラタンパク質単離物を提供するステップと、(d)2Sキャノーラタンパク質を残留液中に保持し、低分子量汚染物質を、透過液として膜通過させるのに効果的な選択的膜技術を用いて、ステップ(a)からの透過液の濃度を増大させるステップと、(e)ステップ(d)からの残留液を乾燥させて、大部分が2Sタンパク質からなり、少なくとも約90重量%(N×6.25)d.b.のタンパク質含量を有するキャノーラタンパク質単離物を提供するステップとを含む方法を提供する。

10

【0015】

20

(図面の簡単な説明)

図1はタンパク質ミセルプロセス上に載せた本発明の一実施形態によるタンパク質溶液回収プロセスの概略を示す図である。

【0016】

(本発明の概略説明)

本明細書で提供する新規なキャノーラタンパク質単離物は、少なくとも約90重量%(N×6.25)、好ましくは少なくとも約100重量%のタンパク質含量を有し、回分プロセスまたは連続プロセスまたは半連続プロセスによってキャノーラ油糧種子粗粉から単離することができる。

【0017】

30

本明細書で提供する新規なキャノーラタンパク質単離物は、大部分が2Sタンパク質からなり、かつキャノーラタンパク質のミセルの生成および沈殿によって上澄み液から得られ、調製の同一実験条件下で調製されるキャノーラタンパク質単離物と比較して、大部分が2Sタンパク質からなり、2Sキャノーラタンパク質の割合が増大しており、7Sキャノーラタンパク質の割合が減少している。

【0018】

新規なキャノーラタンパク質単離物は、少なくとも約85重量%の2Sキャノーラタンパク質と約15重量%未満の7Sキャノーラタンパク質、好ましくは少なくとも約90重量%の2Sキャノーラタンパク質と約10重量%未満の7Sキャノーラタンパク質を含み、より好ましくはできるだけ高い割合の2Sタンパク質を含む。上記のように、そうしたキャノーラタンパク質単離物は濃縮された上澄み液の加熱処理によって得ることができ、以下により詳細に述べる。濃縮された上澄み液の加熱処理によって7Sタンパク質の沈殿がもたらされ、これを、遠心分離などの任意の好都合な手段によって、加熱処理した上澄み液から除去することができる。2Sタンパク質は加熱処理の影響を受けることはなく、したがって、加熱処理は、7Sタンパク質の割合を低減させることによって、存在する2Sタンパク質の割合を増大させる。

40

【0019】

新規キャノーラタンパク質単離物は広い範囲のpH値にわたって水溶液中に可溶性であり、一般に、大部分が2Sタンパク質からなり、かつ調製の同一実験条件下でのキャノーラタンパク質のミセルの生成および沈殿による上澄み液から得られるキャノーラタンパク

50

質単離物より高い溶解性を有している。さらに、市販されているものなどの炭酸ソフトドリンクを含むソフトドリンク中の新規キャノーラタンパク質単離物の水溶液は、大部分が2Sタンパク質からなり、かつ調製の同一実験条件下でのキャノーラタンパク質のミセルの生成および沈殿による上澄み液から得られるキャノーラタンパク質単離物から作製されるそうした水溶液より高い透明度を有している。

【0020】

ソフトドリンク中の溶液を含む水溶液中のキャノーラタンパク質単離物の濃度は、対象とする溶液の使用に応じて変えることができる。一般に、タンパク質濃度は約0.1～約30重量%、好ましくは約1～約5重量%の範囲である。

【0021】

キャノーラタンパク質単離物を提供するプロセスの最初のステップは、キャノーラ油糧種子粗粉からのタンパク質材料を可溶化させることを含む。キャノーラ種子粗粉から回収されたタンパク質材料はキャノーラ種子中に天然に由来するタンパク質であってよく、あるいは、そのタンパク質材料は、遺伝子操作によって改変されてはいるが、天然タンパク質の特徴的な疎水性および極性の特性は保有しているタンパク質であってよい。キャノーラ粗粉は、様々なレベルの非変性タンパク質を有するキャノーラ油糧種子からのキャノーラオイルの除去によって得られた、例えば、熱ヘキサン抽出または冷オイル押出法によって得られた任意のキャノーラ粗粉であってよい。キャノーラ油糧種子からのキャノーラオイルの除去は、通常、本明細書で述べるタンパク質単離物回収手順とは別個の操作として行われる。

【0022】

塩の存在は油糧種子粗粉からの可溶性タンパク質の除去を増進させるので、タンパク質可溶化は、食品グレードの塩溶液を用いることによって最も効果的に行われる。キャノーラタンパク質単離物を食品以外に使用しようとする場合、非食品グレードの化学品を使用することができる。塩は通常塩化ナトリウムであるが、塩化カリウムなどの他の塩も使用することができる。相当量のタンパク質の可溶化を実施可能にするために、塩溶液は、少なくとも約0.05、好ましくは少なくとも約0.10のイオン強度を有する。塩溶液のイオン強度が増大するにしたがって、油糧種子粗粉中のタンパク質の可溶化の程度は最初増大し、次いで最大値に達する。その後、イオン強度がどんなに増加しても、可溶化タンパク質全体を増大させることはない。最大のタンパク質可溶化をもたらす食品グレード塩溶液のイオン強度は、当該の塩および選択された油糧種子粗粉に応じて変わる。

【0023】

イオン強度が増大すると、タンパク質の沈殿のために、より高い希釈度が求められることを考慮して、通常約0.8未満のイオン強度値、より好ましくは約0.1～約0.15の値を用いることが好ましい。

【0024】

回分プロセスでは、タンパク質の塩可溶化を、少なくとも約5℃、好ましくは最大で約35℃の温度で、可溶化時間を短縮するために（通常約10～約60分間である）好ましくは攪拌を伴って実施する。全体としての高い製造収率を得るために、油糧種子粗粉から実質的にできるだけ多くのタンパク質を抽出するように可溶化を実施することが好ましい。

【0025】

それより低いと可溶化が实际的ではないほど遅くなるので、温度の下限は約5℃を選択し、他方、回分様式ではそれより高くなるとプロセスが非経済的になるので、温度の上限は約35℃を選択する。

【0026】

連続プロセスでは、キャノーラ油糧種子粗粉からのタンパク質の抽出は、キャノーラ油糧種子粗粉からのタンパク質の連続的抽出を行うのに合致した任意の方式で実施する。一実施形態では、キャノーラ油糧種子粗粉を食品グレード塩溶液と連続的に混合し、ある長さを有するパイプまたは導管を通して、本明細書で述べるパラメータによる所望の抽出を

10

20

30

40

50

行うのに十分な滞留時間をもたらす流速でその混合物を輸送する。そうした連続的手順では、塩可溶化ステップを、好ましくは、実質的にできるだけ多くのタンパク質をキャノーラ油糧種子から抽出するように可溶化を行うために、迅速に、最大で約 10 分の時間で実施する。連続的手順での可溶化は、高温で、好ましくは少なくとも約 35、一般に約 65 またはそれ以上で実施することが好ましい。

【0027】

食品グレードの塩水溶液は、一般に約 5 ~ 約 6.8、好ましくは約 5.3 ~ 約 6.2 の pH を有し、塩溶液の pH は、抽出ステップで使用するために、必要に応じて好都合な任意の酸、通常塩酸、あるいはアルカリ、通常水酸化ナトリウムを用いて約 5 ~ 約 6.8 の範囲内の任意の所望の値に調節することができる。

10

【0028】

可溶化ステップの際の食品グレードの塩溶液中の油糧種子粗粉の濃度は広い範囲にわたる。典型的な濃度値は約 5 ~ 約 15 % w / v である。

【0029】

塩水溶液を用いたタンパク質抽出ステップは、キャノーラ粗粉中に存在する可能性のある脂肪を可溶化させる追加の効果を有しており、したがって、それによって脂肪が水相中に存在する結果となる。

【0030】

抽出ステップから得られたタンパク質溶液は、一般に約 5 ~ 約 40 g / L、好ましくは約 10 ~ 約 30 g / L のタンパク質濃度を有する。

20

【0031】

塩水溶液は酸化防止剤を含むことができる。酸化防止剤は亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸などの好都合な任意の酸化防止剤でよい。用いる酸化防止剤の量は溶液の約 0.01 ~ 約 1 重量% の範囲でよく、好ましくは約 0.05 重量% である。酸化防止剤は、タンパク質溶液中でフェノール類の酸化を抑制する働きをする。

【0032】

次いで、抽出ステップから得られた水相を、好都合な任意の方式で、例えば、デカンター型遠心分離機に続いて、ディスク型遠心分離および/または濾過を用いて残留粗粉を除去することによって、残留するキャノーラ粗粉から分離することができる。分離した残留粗粉を乾燥して処分することができる。

30

【0033】

最終キャノーラタンパク質単離物の色は、粉末の活性炭または他の色素吸着剤を、分離したタンパク質水溶液と混合し、続いて吸着剤を、好都合には濾過で除去してタンパク質溶液を提供することによって、薄い色 (light colour) でより淡い黄色 (less intense yellow) に改善することができる。色素を除去するためにダイアフィルトレーションを用いることもできる。

【0034】

そうした色素除去のステップは、一般に分離したタンパク質水溶液の周囲温度で、好都合な任意の条件下、適切な色素吸着剤を用いて実施することができる。粉末状活性炭は、約 0.025 % ~ 約 5 重量 / 容積 %、好ましくは約 0.05 % ~ 約 2 重量 / 容積 % の量で使用する。

40

【0035】

本譲受人に譲渡されている米国特許第 5,844,086 号および第 6,005,076 号 (その開示を参照により本明細書に組み込む) に記載のように、キャノーラ種子粗粉が相当量の脂肪を含有する場合、分離したタンパク質水溶液および以下に述べる濃縮タンパク質水溶液に対して上記特許に記載の脱脂ステップを施すことができる。色を改善するステップを実施する場合、そのステップは第 1 の脱脂ステップの後に実施することができる。

【0036】

塩水溶液を用いた油糧種子粗粉の抽出の代わりとして、水だけを用いて抽出を行うこと

50

ができる。しかし、水だけの使用では塩水溶液の場合より油糧種子粗粉からのタンパク質の抽出がより少ない傾向にある。そうした代替法を用いる場合、以下に述べる濃縮ステップの間、タンパク質を溶液中に保持するために、残留油糧種子粗粉から分離した後に、先に論じた濃度で塩をタンパク質溶液に加えることができる。第1の脱脂除去ステップを行う場合、通常そうした操作が完了した後で塩を加える。

【0037】

別の代替手順は、約6.8を超える比較的高いpH値、一般に最大で約9.9で、食品グレードの塩溶液を用いて油糧種子粗粉を抽出するものである。水酸化ナトリウム水溶液などの好都合な任意の食品グレードアルカリを用いて、食品グレード塩溶液のpHを所望のアルカリ値にpHを調節することができる。あるいは、油糧種子粗粉を、約pH5未満の比較的低いpH、一般に最小で約pH3で、塩溶液を用いて抽出することができる。そうした代替法を用いる場合、次いで、好都合な任意の方式で、例えば、デカンター型遠心分離機に続いてディスク型遠心分離および/または濾過を用いて残留粗粉を除去することによって、油糧種子粗粉抽出ステップから得られる水相を、残留するキャノーラ粗粉から分離する。分離した残留粗粉は乾燥して処分することができる。

10

【0038】

次いで、その高pH抽出または低pH抽出のステップから得られたタンパク質水溶液を、以下で述べるさらなる処理にかける前に、先に論じた約5~約6.8、好ましくは約5.3~約6.2にpH調節する。そうしたpH調節は、任意の好都合な酸、例えば塩酸など、あるいは必要に応じて水酸化ナトリウムなどのアルカリを用いて行うことができる。

20

【0039】

タンパク質水溶液は、新規なキャノーラタンパク質単離物を生成するように処理するために、7Sリッチなタンパク質ミセルの集団を沈殿させて上澄み液を残すか、あるいは、タンパク質水溶液を二膜操作によってタンパク質ミセルの集団を沈殿させることなく処理して新規なキャノーラタンパク質単離物を得るかによる2つの代替手順で処理することができる。

【0040】

第1の代替手順では、タンパク質水溶液を濃縮してそのタンパク質濃度を増大させ、同時にそのイオン強度を実質的に一定に保持する。そうした濃度は通常、少なくとも約50g/L、好ましくは少なくとも約200g/L、より好ましくは少なくとも約250g/Lのタンパク質濃度を有する濃縮タンパク質溶液を提供するように実施する。

30

【0041】

濃縮ステップは、例えば、異なる膜材料および構造を考慮して約3,000~約100,000ダルトン、好ましくは約5,000~約10,000ダルトンなどの適切な分子量カットオフを有する中空繊維膜または螺旋巻型膜(spiral wound membrane)等の膜を用いた限外濾過またはダイアフィルトレーションなどの好都合な任意の選択的膜技術を用いるなどの回分操作または連続操作に合致した好都合な任意の方式で実施することができる。連続操作のためには、タンパク質水溶液が膜を通過する際に、所望の程度の濃度が可能になるような寸法にする。

【0042】

次いで、濃縮タンパク質溶液を抽出溶液と同じモル濃度およびpHの塩水溶液を用いてダイアフィルトレーションステップにかけることができる。そうしたダイアフィルトレーションは、約2~約20容のダイアフィルトレーション溶液、好ましくは約5~約10容のダイアフィルトレーション溶液を用いて実施することができる。ダイアフィルトレーション操作において、膜を通して透過液を通過させてタンパク質水溶液からさらなる量の汚染物質を除去する。さらなる有意の量のフェノール類および目視できる色が透過液中に存在しなくなるまでダイアフィルトレーション操作を行うことができる。そうしたダイアフィルトレーションは濃縮ステップ用と同一の膜を使用して実施することができる。しかし、望むなら、ダイアフィルトレーションステップは、異なる分子量カットオフを有する分離膜、例えば、異なる膜材料および構造を考慮して約3,000~約100,000ダルト

40

50

ン、好ましくは約 5,000 ~ 約 10,000 ダルトンの範囲の分子量カットオフを有する膜を使用して実施することができる。

【0043】

ダイアフィルトレーションステップの少なくとも一部の間、ダイアフィルトレーション媒体中に酸化防止剤を存在させることができる。酸化防止剤は亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸などの好都合な任意の酸化防止剤でよい。ダイアフィルトレーション媒体中で使用する酸化防止剤の量は用いる材料に依存し、約 0.01 ~ 約 1 重量%の範囲で変わり、好ましくは約 0.05 重量%である。酸化防止剤は、濃縮されたキャノーラタンパク質単離物溶液中に存在するフェノール類の酸化を抑制する働きをする。

【0044】

濃縮ステップおよびダイアフィルトレーションステップは、好都合な任意の温度、一般に約 20 ~ 約 60、好ましくは約 20 ~ 約 30 で、所望の程度の濃縮を行える時間で実施することができる。用いる温度および他の条件は、ある程度、濃縮を行うための膜装置および溶液の所望のタンパク質濃度の影響を受ける。

【0045】

このステップでタンパク質溶液を、好ましい約 200 g/L を超える濃度まで濃縮すると、乾燥タンパク質単離物として回収された抽出タンパク質の割合に関して、工程収率を約 40% 超、好ましくは約 80% 超のレベルに増大させるだけでなく、乾燥後の最終タンパク質単離物の塩濃度を低減させる。塩濃度の変動が特定の食品用途における機能特性および感覚特性に影響を及ぼす単離物の応用分野では、単離物の塩濃度を制御できる能力が重要である。

【0046】

周知の通り、限外濾過および類似の選択的膜技術は、低分子量の種を通過させ同時により高分子量の種が通過するのを阻止する。低分子量種には、食品グレード塩のイオン種だけでなく、炭水化物、色素および抗栄養要素などの供給材料から抽出された低分子量材料、ならびに任意の低分子量形態のタンパク質も含まれる。膜の分子量カットオフは通常、相当な割合のタンパク質を溶液中に確実に保持し、同時に汚染物質を通過させるように異なる膜材料および構造を考慮して選択される。

【0047】

濃縮され、場合によりダイアフィルトレーションされたタンパク質溶液は、必要に応じ、米国特許第 5,844,086 号および第 6,005,076 号に記載のようにしてさらなる脱脂操作にかけることができる。

【0048】

濃縮され、場合によりダイアフィルトレーションされたタンパク質溶液を、上記の色除去操作の代替法としての色除去操作にかけることができる。本明細書では、粉末状活性炭も顆粒状活性炭 (GAC) と同様に使用することができる。色吸収剤として使用できる他の材料はポリビニルピロリドンである。

【0049】

色吸収剤処理ステップは、好都合な任意の条件下、一般にキャノーラタンパク質溶液の周囲温度で実施することができる。粉末状活性炭は、約 0.025% ~ 約 5 重量/容積%、好ましくは約 0.05% ~ 約 2 重量/容積%の量を使用することができる。色吸収剤としてポリビニルピロリドンを使用する場合、約 0.5% ~ 約 5 重量/容積%、好ましくは約 2% ~ 約 3 重量/容積%の量を使用することができる。色吸収剤は濾過などの好都合な任意の手段でキャノーラタンパク質溶液から除去することができる。

【0050】

貯蔵またはそれ以外の結果、元の粗粉中に存在しており、かつ、抽出ステップでその粗粉からキャノーラタンパク質単離物溶液中へ抽出された可能性のあるバクテリアを殺すために、任意選択の色除去ステップから得られた濃縮され、任意選択でダイアフィルトレーションされたタンパク質溶液に低温殺菌を施すことができる。そうした低温殺菌は所望の任意の低温殺菌条件下で実施することができる。一般に、濃縮され、任意選択でダイアフ

10

20

30

40

50

ィルトレーションされたタンパク質溶液を、約 55 ～ 約 70 、好ましくは約 60 ～ 約 65 の温度で、約 10 ～ 約 15 分間、好ましくは約 10 分間加熱する。次いで低温殺菌した濃縮タンパク質溶液を、以下に述べるさらなる処理のために、好ましくは約 25 ～ 約 40 の温度に冷却することができる。

【0051】

濃縮ステップおよび任意選択のダイアフィルトレーションステップで用いた温度と、低温殺菌ステップを行ったかどうかとに応じて、濃縮タンパク質溶液を、少なくとも約 20 、最大で約 60 、好ましくは約 25 ～ 約 40 の温度に加熱し、濃縮タンパク質溶液の粘度を低下させて、続く希釈ステップおよびミセル生成の遂行を容易にすることができる。濃縮タンパク質溶液は、それを超えると冷水で希釈してもミセル生成が起こらないような温度以上に加熱すべきではない。

10

【0052】

次いで、濃縮ステップ、ならびに任意選択のダイアフィルトレーションステップ、任意選択の色除去ステップ、任意選択の低温殺菌ステップおよび任意選択の脱脂ステップから得られた濃縮タンパク質溶液を、濃縮タンパク質溶液を所望の希釈度を達成するのに必要な容積を有する冷水と混合することによって、希釈してミセルを生成させる。ミセル経路で得ようとするキャノーラタンパク質の割合、および上澄み液からの割合に応じて、濃縮タンパク質溶液の希釈度を変えることができる。より高い希釈レベルでは、一般に、より高い割合のキャノーラタンパク質が水相に残留する。

【0053】

20

ミセル経路によって、最も高い割合のタンパク質を望む場合、濃縮タンパク質溶液を約 1.5 倍以下、好ましくは約 1.0 倍以下で希釈する。

【0054】

濃縮タンパク質溶液と混合する冷水は、約 15 未満、一般に約 3 ～ 約 15 、好ましくは約 10 未満の温度を有する。その理由は、用いた希釈倍率では、このより冷たい温度で、タンパク質ミセルの集団の形態のタンパク質単離物が高い収率で得られるからである。

【0055】

回分操作では、上記のように所望の容積を有する冷水の静止状の本体(static body)に、濃縮タンパク質溶液のバッチを加える。濃縮タンパク質溶液の希釈と、続くイオン強度の低下によって、ミセル状の分散したタンパク質液滴の形態の高度に会合したタンパク質分子の雲状の集団を生成する。回分式手順では、タンパク質ミセルが冷水の本体中で沈降して、凝集し、合体した密な無定形の付着性グルテン様タンパク質ミセルの集団(PMM)が生成する。遠心分離などによって沈降を助けることができる。そうした誘発による沈降によってタンパク質ミセルの集団の液体含量が減少し、それによって水分含量を、一般に全ミセルの集団の約 70 重量% ～ 約 95 重量% から、一般に約 50 重量% ～ 約 80 重量% の値に減少させる。この仕方ではミセルの集団の水分含量が減少すると、ミセルの集団の吸蔵塩含量、したがって乾燥単離物の塩含量も低下する。

30

【0056】

あるいは、濃縮タンパク質溶液を T 字形パイプの一方の入口に連続的に通過させ、同時に、希釈水を T 字形パイプの他方の入口に供給してパイプ中で混合させることによって、希釈操作を連続的に行うことができる。希釈水は、濃縮タンパク質溶液の所望の希釈度を達成するのに十分な割合で T 字形パイプ中に供給する。

40

【0057】

濃縮タンパク質溶液と希釈水のパイプ内での混合によって、タンパク質ミセルの生成が開始され、混合物は T 字形パイプの出口から沈降容器中へ連続的に供給され、満杯になったらそこから上澄み液をオーバーフローさせる。混合物は、液体の本体内の乱れを最少にする方式で、沈降容器中の液体の本体内に供給するのが好ましい。

【0058】

連続的な手順では、タンパク質ミセルを沈降容器中で沈降させて、凝集し、合体した密

50

な無定形の付着性グルテン様タンパク質ミセルの集団（PMM）を形成させ、所望の量のPMMが沈降容器の底部に蓄積されるまでこの手順を続行し、次いで蓄積されたPMMを沈降容器から取り出す。沈殿による沈降の代りに、PMMを遠心分離で連続的に分離することができる。

【0059】

タンパク質溶液を少なくとも約200 g/Lの好ましいタンパク質含量へ濃縮させるプロセスパラメータの組合せと、約15未満の希釈倍率の使用によって、上記米国特許で論じた既知の従来技術のいずれかのタンパク質単離物生成手順を用いて達成された場合より、元の粗粉抽出物からのタンパク質ミセルの集団の形態のタンパク質の回収に関してより高い収率、しばしば著しく高い収率がもたらされ、かつ、タンパク質含量に関して、ずっと高い純度の単離物がもたらされる。

10

【0060】

回分プロセスと比べて、キャノーラタンパク質単離物の回収に連続プロセスを利用することによって、同一レベルのタンパク質抽出について、最初のタンパク質抽出ステップの時間が著しく短縮され、かつ、抽出ステップで相当高い温度を用いることが可能になる。さらに連続操作では、回分手順の場合より汚染の機会が少なくなり、それによってより高い製品品質が得られ、プロセスをより小型の装置で実施するようになる。

【0061】

沈降した単離物は、例えば、沈降した集団からの残留水相のデカンテーションかまたは遠心分離によって、残留水相または上澄み液から分離する。PMMは、湿潤した形態で使用することも、また噴霧乾燥または凍結乾燥などの好都合な任意の技術で乾燥して乾燥形態で使用することもできる。乾燥PMMは、約90重量%を上回るタンパク質、好ましくは少なくとも約100重量%タンパク質（Kjeldahl N×6.25として計算して）の高いタンパク質含量を有し、実質的に変性していない（示差走査熱量測定で測定して）。必要に応じて米国特許第5,844,086号および第6,005,076号の手順を用いた場合、油脂種子粗粉から単離された乾燥PMMも低い残留脱脂含量を有する。それは約1重量%未満であってよい。

20

【0062】

上記米国特許出願第10/413,371号に記載されているように、PMMは大部分が、約60～98重量%の7Sタンパク質、約1～約15重量%の12Sタンパク質および0～約25重量%の2Sタンパク質のタンパク質成分含量を有する7Sキャノーラタンパク質からなる。

30

【0063】

PMM生成および沈降ステップからの上澄み液は、希釈ステップで沈殿しなかった相当量のキャノーラタンパク質を含み、これを処理してキャノーラタンパク質単離物を回収する。上記米国特許出願第10/413,371号に記載されているように、上澄み液から得られるキャノーラタンパク質単離物は大部分が、約60～約95重量%の2Sタンパク質、約5～約40重量%の7Sタンパク質および0～約5重量%の12Sタンパク質のタンパク質成分含量を有する2Sキャノーラタンパク質からなる。

【0064】

PMMの除去に続いて、希釈ステップからの上澄み液を濃縮してそのタンパク質濃度を増大させる。そうした濃縮は、タンパク質供給材料から抽出された塩および他の非タンパク質低分子量材料を含む低分子量種を膜通過させ、同時に、キャノーラタンパク質を溶液中に保持する適切な分子量カットオフを有する膜を用いる限外濾過などの好都合な任意の選択的膜技術を用いて実施する。異なる膜材料および構造を考慮して約3,000～100,000ダルトン、好ましくは約5,000～約10,000ダルトンの分子量カットオフを有する限外濾過膜を使用することができる。この方法での上澄み液の濃縮によって、乾燥してタンパク質を回収するのに必要な液体の容積も低減される。上澄み液は一般に、乾燥の前に、少なくとも約50 g/L、好ましくは約100～約400 g/L、より好ましくは約200～約300 g/Lのタンパク質濃度まで濃縮する。そうした濃縮操作は

40

50

、タンパク質溶液濃縮ステップについて上記したように、回分様式または連続操作で実施することができる。

【0065】

次いで、濃縮された上澄み液を、水を用いてダイアフィルトレーションステップにかけることができる。そうしたダイアフィルトレーションは、約2～約20容のダイアフィルトレーション溶液、好ましくは約5～約10容のダイアフィルトレーション溶液を用いて実施することができる。ダイアフィルトレーション操作においては、透過液を膜通過させることによって、さらなる量の汚染物質が上澄み水溶液から除去される。ダイアフィルトレーション操作は、透過液中にそれ以上の有意の量のフェノール類および目視できる色が存在しなくなるまで行うことができる。そうしたダイアフィルトレーションは濃縮ステップ用と同じ膜を使用して行うことができる。しかし、所望により、ダイアフィルトレーションは、異なる膜材料および構造を考慮して約3,000～約100,000ダルトン、好ましくは約5,000～約10,000ダルトンの範囲の分子量カットオフを有する膜などの分離膜を用いて行うことができる。

10

【0066】

ダイアフィルトレーションステップの少なくとも一部の間、ダイアフィルトレーション媒体中に酸化防止剤が存在していてもよい。酸化防止剤は、亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸などの好都合な任意の酸化防止剤でよい。ダイアフィルトレーション媒体中で用いる酸化防止剤の量は用いる材料に依存し、約0.01～約1重量%の範囲でよく、好ましくは約0.05重量%である。酸化防止剤は、濃縮されたキャノーラタンパク質単離物溶液中に存在するフェノール類の酸化を抑制する働きをする。

20

【0067】

本発明によれば、濃縮され、任意選択でダイアフィルトレーションされた上澄み液を加熱処理し、7Sタンパク質を沈殿させ除去することによって、溶液中に存在する7Sタンパク質の量を低減させ、それによって濃縮された上澄み液中に存在するキャノーラタンパク質中の2Sタンパク質の割合を増大させることができる。

【0068】

そのような加熱処理は、濃縮された上澄み液中に存在する7Sの割合を低減させる、好ましくは7Sタンパク質の割合を相当な程度に低減させるのに十分な温度と時間のプロファイルを用いて実施することができる。一般に、加熱処理によって、上澄み液の7Sタンパク質含量を少なくとも約50重量%、好ましくは少なくとも約75重量%減少させる。一般に、加熱処理は、約70～約100、好ましくは約75～約95の温度で、約2～約30分間、好ましくは約5～約15分間実施することができる。沈殿した7Sタンパク質は遠心分離または濾過などの好都合な任意の方式で除去することができる。

30

【0069】

分解した7Sタンパク質を遠心分離などによって除去した後、濃縮された加熱処理した上澄み液を、噴霧乾燥または凍結乾燥などの好都合な任意の技術で乾燥した形態に乾燥して、本発明によるキャノーラタンパク質単離物を提供することができる。そのような新規なキャノーラタンパク質単離物は、約90重量%を上回る、好ましくは少なくとも約100重量%タンパク質(Kjeldahl N×6.25として計算して)の高いタンパク質含量を有し、実質的に変性していない(示差走査熱量測定で測定して)。

40

【0070】

そのような新規なキャノーラタンパク質単離物は、高い割合の2Sタンパク質、好ましくは単離物中のキャノーラタンパク質の少なくとも90重量%、最も好ましくは少なくとも約95重量%を含む。

【0071】

新規なキャノーラタンパク質単離物を作製するための代替の手順では、7Sおよび12Sタンパク質を残留液中に保持し、2Sタンパク質を膜通過させるのに十分な分子量カットオフを有する中空繊維膜または螺旋巻型膜などの膜を用いた第1の限外濾過ステップによって、キャノーラ油糧種子タンパク質粗粉の抽出によって作製されたタンパク質水溶液

50

を濃縮してそのタンパク質濃度を増大させ、同時に、そのイオン強度を実質的に一定に保持する。膜のための適切な分子量カットオフ範囲は、約 30,000 ~ 約 150,000 ダルトン、好ましくは約 50,000 ~ 約 100,000 ダルトンである。連続操作のためには、膜を、タンパク質水溶液が膜を通過する際に、所望の濃縮度になるような寸法にする。

【0072】

第1の限外濾過ステップを、タンパク質水溶液を約4 ~ 約20倍にして、少なくとも約50 g/L、好ましくは少なくとも約200 g/L、より好ましくは少なくとも約250 g/Lのタンパク質濃度に濃縮するように行うことができる。

【0073】

次いで、濃縮タンパク質溶液を、抽出溶液と同じモル濃度とpHの塩水溶液を用いてダイアフィルトレーションステップにかけることが好ましい。濃縮されたキャノーラタンパク質単離物溶液中のフェノール類の酸化を抑制するために、ダイアフィルトレーションステップの少なくとも一部の間、ダイアフィルトレーション媒体中に酸化防止剤を存在させることができる。酸化防止剤は亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸などの好都合な任意の酸化防止剤でよい。ダイアフィルトレーション媒体中で用いる酸化防止剤の量は使用する材料に依存し、約0.01 ~ 約1重量%の範囲であり、好ましくは約0.05重量%である。

【0074】

ダイアフィルトレーションステップは、約2 ~ 約20容のダイアフィルトレーション溶液、好ましくは約5 ~ 約10容のダイアフィルトレーション溶液を用いて実施することができる。ダイアフィルトレーション操作の間に、他の低分子量成分と一緒に2Sタンパク質のフェノール類および目視できる色成分を、透過液を膜通過させることによって、濃縮タンパク質溶液から除去することができる。

【0075】

ダイアフィルトレーションステップは、濃縮ステップに使用したのと同じ膜を用いて行うことができる。

【0076】

濃縮ステップおよびダイアフィルトレーションステップは、好都合な任意の温度、一般に約20 ~ 約60、好ましくは約30未満で、所望の程度の濃縮および洗浄を実現する時間で実施することができる。用いる温度および他の条件は、ある程度、濃縮を行うために使用する膜装置と溶液の所望のタンパク質濃度に依存する。

【0077】

第1の限外濾過ステップで使用する膜は、相当な割合の2Sタンパク質を、食品グレード塩のイオン種、炭水化物、フェノール類、色素および抗栄養要素を含む他の低分子量種と一緒に透過液中へ通過させる。分子量カットオフは、通常相当な割合の7Sおよび12Sタンパク質を残留液中に確実に保持し、同時に、2Sタンパク質および汚染物質を通過させるように異なる膜材料および構造を考慮して選択される。

【0078】

次いで、濃縮ステップおよび任意選択のダイアフィルトレーションステップからの残留液を、噴霧乾燥または凍結乾燥などの好都合な任意の技術によって乾燥して乾燥形態にする。乾燥したタンパク質は、約90重量%を超えるタンパク質、好ましくは少なくとも約100重量%タンパク質(Nx6.25)の高いタンパク質含量を有し、実質的に変性していない(示差走査熱量測定で測定して)。乾燥したタンパク質単離物は、大部分キャノーラ7Sタンパク質からなり、若干の12Sタンパク質と可能的に少量の2Sタンパク質を有する。一般に、乾燥キャノーラタンパク質単離物は：

約60 ~ 約95重量%の7Sタンパク質

約2 ~ 約15重量%の12Sタンパク質

0 ~ 約30重量%の2Sタンパク質

を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 9 】

好ましくは、乾燥キャノーラタンパク質単離物は：

約 7 0 ～ 約 9 0 重量 % の 7 S タンパク質

約 5 ～ 約 1 0 重量 % の 1 2 S タンパク質

0 ～ 約 2 0 重量 % の 2 S タンパク質

を含む。

【 0 0 8 0 】

濃縮ステップおよび任意選択のダイアフィルトレーションステップからの透過液を、2 S タンパク質を保持するが、塩、フェノール類、色成分および抗栄養要素を含む低分子量種を膜通過させる適切な分子量カットオフを有する中空繊維膜または螺旋巻型膜などの膜を用いて第 2 の限外濾過ステップで濃縮する。異なる膜材料および構造を考慮して約 3 , 0 0 0 ～ 約 3 0 , 0 0 0 ダルトン、好ましくは約 5 , 0 0 0 ～ 約 1 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量カットオフを有する限外濾過膜を使用することができる。透過液は、一般に、乾燥する前に少なくとも約 5 0 g / L、好ましくは約 1 0 0 ～ 約 4 0 0 g / L、より好ましくは約 2 0 0 ～ 約 3 0 0 g / L のタンパク質濃度に濃縮する。そうした濃縮操作は、上記タンパク質溶液濃縮ステップで述べたように、回分様式または連続操作で実施することができる。

10

【 0 0 8 1 】

濃縮された透過液を、水を用いてダイアフィルトレーションステップにかけることができる。濃縮された透過液中のフェノール類の酸化を抑制するために、ダイアフィルトレーションステップの少なくとも一部の間、ダイアフィルトレーション媒体中に酸化防止剤が存在してもよい。酸化防止剤は、亜硫酸ナトリウムまたはアスコルビン酸などの好都合な任意の酸化防止剤でよい。ダイアフィルトレーション媒体中で使用する酸化防止剤の量は用いる材料に依存し、約 0 . 0 1 ～ 約 1 重量 % の範囲であり、好ましくは約 0 . 0 5 重量 % である。

20

【 0 0 8 2 】

ダイアフィルトレーションステップは、2 ～ 2 0 容のダイアフィルトレーション溶液、好ましくは約 5 ～ 約 1 0 容のダイアフィルトレーション溶液を用いて実施することができる。ダイアフィルトレーション操作では、フェノール類および目視できる色成分を含むさらなる量の汚染物質を、ダイアフィルトレーション膜を通過させることによって、濃縮された透過液から除去する。さらに相当な量のフェノール類と目視できる色成分が透過液中に除去されなくなるまでダイアフィルトレーション操作を行うことができる。

30

【 0 0 8 3 】

ダイアフィルトレーションステップは、濃縮ステップで使用するものと同じ膜を用いて実施することができる。あるいは、異なる膜材料および構造を考慮して約 3 0 0 0 ～ 約 5 0 , 0 0 0 ダルトン、好ましくは約 5 , 0 0 0 ～ 約 1 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量カットオフを有する分離膜を使用することができる。

【 0 0 8 4 】

濃縮され、任意選択でダイアフィルトレーションされた透過液は、噴霧乾燥または凍結乾燥などの好都合な任意の技術によって乾燥して、乾燥した形態にする。乾燥したタンパク質は、約 9 0 重量 % を超えるタンパク質、好ましくは少なくとも約 1 0 0 重量 % (N x 6 . 2 5) の高いタンパク質含量を有し、実質的に変性していない (示差走査熱量測定で測定して) 。乾燥キャノーラタンパク質単離物は、大部分がキャノーラ 2 S タンパク質からなり、7 S タンパク質は少量である。一般に、乾燥キャノーラタンパク質単離物は：

40

約 8 5 ～ 約 1 0 0 重量 % の 2 S タンパク質

0 ～ 約 1 5 重量 % の 7 S タンパク質、

好ましくは約 9 0 ～ 約 1 0 0 重量 % の 2 S タンパク質

0 ～ 約 1 0 重量 % の 7 S タンパク質

を含む。

【 0 0 8 5 】

50

所望により、第1の限外濾過ステップからの濃縮されたキャノーラタンパク質単離物の部分と、第2の限外濾過ステップからの濃縮された透過液の部分とを一緒にし、続いて一緒にしたストリームを好都合な任意の技術で乾燥して、一緒にしたキャノーラタンパク質単離組成物を提供することができる。一緒に混合されたタンパク質材料の相対的割合は、所望の2S/7S/12Sタンパク質プロファイルを有する生成キャノーラタンパク質単離組成物を提供するように選択することができる。あるいは、乾燥したタンパク質単離物を所望の任意の割合で一緒にして、混合物における所望の任意の特定の2S/7S/12Sタンパク質プロファイルを提供することができる。一緒にしたキャノーラタンパク質単離組成物は、約90重量%を上回る、好ましくは少なくとも約100重量%(N×6.25として計算して)の高いタンパク質含量を有し、実質的に変性していない(示差走査熱量測定で測定して)。

10

【0086】

この方式で操作することによって、多くのキャノーラタンパク質単離物を、第1の限外濾過誘導のキャノーラタンパク質単離物と第2の限外濾過誘導のキャノーラタンパク質単離物との様々な重量割合、一般に重量で約5:95~約95:5の乾燥混合物として回収することができる。これは、組成物中の異なる割合の2S/7S/12Sタンパク質を基にした異なる官能特性および栄養特性を得るために望ましいことである。

【0087】

(好ましい実施形態の説明)

図1を参照すると、ミセル経路によるキャノーラタンパク質単離物(CPI)の生成と比較して、本発明の一態様により提供される新規な二膜プロセスが示されている。

20

【0088】

図から分かるように、限外濾過およびダイアフィルトレーションステップを含んでよい第1の限外濾過段階(限外濾過#1)からの保持液(retentate)を、2つのうちの1つの方法で処理する。本発明の二膜プロセスでは、残留液を噴霧乾燥して大部分が7Sキャノーラタンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を提供する。

【0089】

上記米国特許出願第10/137,321号の手順では、残留液は希釈ステップへ進み、そこでキャノーラタンパク質単離物がタンパク質ミセルの集団として沈殿する。タンパク質ミセルの集団を噴霧乾燥して、大部分が7Sキャノーラタンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を提供する。

30

【0090】

本発明の二膜プロセスでは、第1の限外濾過ステップからの透過液を、限外濾過およびダイアフィルトレーションを含んでよい第2の限外濾過ステップ(限外濾過#2-A)にかける。第2の限外濾過ステップからの残留液を噴霧乾燥して、大部分が2Sタンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を提供する。

【0091】

米国特許第10/137,321号の手順では、タンパク質ミセルの集団の沈殿による上澄み液を限外濾過およびダイアフィルトレーションを含んでよい限外濾過ステップ(限外濾過#2-B)にかける。限外濾過ステップからの残留液を噴霧乾燥して、大部分が2Sタンパク質であるキャノーラタンパク質単離物を提供する。

40

【0092】

上記のように、後者の限外濾過ステップからの残留液を加熱処理して、残留液中の7Sタンパク質の割合を低減させ、本発明の新規なキャノーラタンパク質単離物を提供することができる。

【0093】

(実施例)

実施例1:

この実施例では、本発明の一実施形態による新規なキャノーラタンパク質単離物の作製について説明する。

50

【 0 0 9 4 】

「 a 」 k g のキャノーラ粗粉を周囲温度で「 b 」 L の 0 . 1 M N a C l 溶液に加え、30 分間攪拌してタンパク質水溶液を得た。残留するキャノーラ粗粉を除去し、得られたタンパク質溶液を遠心分離および濾過で清澄化して、「 d 」重量 % のタンパク質含量を有する「 c 」 L の濾過されたタンパク質溶液を得た。

【 0 0 9 5 】

一定分量「 e 」 L のタンパク質抽出溶液を、5 , 0 0 0 ダルトンの分子量カットオフを有するポリビニリデンジフルオライド (P V D F) 膜で濃縮して容積を「 f 」 L に低減させ、次いで同じ膜で、「 g 」 L の 0 . 1 M N a C l 溶液を用いてダイアフィルトレーションした。次いでダイアフィルトレーションした保持液を 6 0 で 1 0 分間低温殺菌した。得られた低温殺菌した濃縮タンパク質溶液は「 h 」重量 % のタンパク質含量を有していた。

10

【 0 0 9 6 】

「 i 」 の濃縮された溶液を「 j 」の比で「 k 」 の温度の冷 R O 水中に入れて希釈した。直ちに白色の雲状物が生成し、これを沈降させた。上部希釈水を除去し、沈殿した粘性の付着性集団 (P M M) を、容器の底部から濾過タンパク質溶液の「 l 」重量 % の収率で回収した。乾燥 P M M 誘導のタンパク質は「 m 」 % ($N \times 6 . 2 5$) d . b . のタンパク質含量を有することがわかった。この生成物を「 n 」 C 3 0 0 と表示した。

【 0 0 9 7 】

2 つの実験についてのパラメータ「 a 」 ~ 「 n 」を以下の表 I に示す。

20

【 0 0 9 8 】

【 表 1 】

表 I

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
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

30

【 0 0 9 9 】

1 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量カットオフを有するポリエーテルスルホン (P E S) 膜を用いた限外濾過で、除去した上澄み液の容積を「 o 」 L に低減させ、次いで濃縮物を、同じ膜で「 p 」 L の水でダイアフィルトレーションした。次いで、ダイアフィルトレーションされた濃縮物を 6 0 で 1 0 分間低温殺菌した。低温殺菌した濃縮物は「 q 」重量 % のタンパク質を含有していた。上澄み液から回収した追加のタンパク質を合わせて、濾過したタンパク質溶液の全体のタンパク質回収率は「 r 」重量 % であった。低温殺菌した濃縮物を等量で 2 分割した。その一方の部分を噴霧乾燥して最終生成物を得た。これを「 n 」 C 2 0 0 と表示した。これは「 s 」 % ($N \times 6 . 2 5$) d . b . のタンパク質含量を有していた。

40

【 0 1 0 0 】

2 つの実験についてのパラメータ「 n 」 ~ 「 s 」を以下の表 I I に示す。

【 0 1 0 1 】

50

【表 2】

表 1 1

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

10

【0102】

低温殺菌され、濃縮された上澄み液の他方の部分を 85 で 10 分間加熱し、次いで遠心分離機にかけて沈殿したタンパク質を除去した。次いで得られた濃縮物を噴霧乾燥して最終生成物を得た。これを「n」C200Hと表示した。「t」%(N×6.25)のタンパク質含量を有していた。2つの実験についてのパラメータ「n」および「t」を以下の表 I I I に示す。

【0103】

【表 3】

表 1 1 1

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

20

【0104】

実施例 2：

この実施例は、濃縮上澄み液から得られたキャノーラタンパク質単離物のタンパク質プロファイルに対する加熱温度と時間の影響を示す。

【0105】

実施例 1 に記載のようにして調製したバッチ S A 0 3 5 - J 1 4 - 0 4 A からの C 2 0 0 キャノーラタンパク質単離物の溶液を、逆浸透精製水中で調製して 5 重量 % のタンパク質濃度を得た。磁気攪拌子を用いてタンパク質と水を 1 時間室温で攪拌して溶液を調製した。

30

【0106】

温度制御した水浴の中で、遠心分離管中のタンパク質溶液 (2 5 m l) のサンプルを加熱した。サンプルを 7 5 、 8 0 、 8 5 、 9 0 または 9 5 の温度で 1 0 分間加熱した。サンプルの内部温度が所望のレベルの 1 以内になったら時間計測を開始し、加熱の過程を通して、サンプルを絶えず攪拌した。加熱処理後、サンプルを 8 , 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離機にかけ、上澄み液をタンパク質プロファイルについてサイズ排除 H P L C で分析した。

【0107】

得られた結果を以下の表 I V に示す。

40

【0108】

【表 4】

表Ⅰ V－異なる温度に加熱したC200溶液のタンパク質プロファイル

処理温度	%7S	%2S
対照（加熱なし）	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

10

【0109】

表Ⅰ Vに示した結果から分かるように、加熱処理を施したものはすべて、サンプルより7 Sタンパク質が大幅に低減される結果となった。90℃での処理において7 Sのレベルが最も低い結果となり、温度を95℃に上げてそれ以上の改善は得られなかった。サイズ排除HPLC分析によって、2 Sのピーク面積に対して加熱処理は殆んど影響を及ぼしていないと判断された。これは、加熱処理によって、2 Sタンパク質の損失は最少の結果であったことを意味している。

【0110】

タンパク質溶液（80 ml）のサンプルを、90℃の温度に設定した循環型水浴に取り付けられたジャケット付き容器中で加熱し、サンプルを磁気攪拌子で攪拌した。5、10および15分間の加熱時間後に一定分量の加熱した溶液を取り出した。サンプル温度が85℃に達するまで時間計測を開始しなかった。加熱処理後、収集したサンプルを8,000 gで10分間遠心分離機にかけ、上澄み液を分析した。

20

【0111】

得られた結果を以下の表Ⅴに示す。

【0112】

【表 5】

表Ⅴ－異なる時間加熱したC200溶液のタンパク質プロファイル

処理時間	%7S	%2S
対照（加熱なし）	22.6	77.4
5 分	1.8	98.2
10 分	1.9	98.1
15 分	1.9	98.1

30

【0113】

表Ⅴに示した結果から分かるように、試験したいずれの時間においても、サンプル中の7 Sタンパク質のレベルに有意の差はなかった。

【0114】

この実施例に示した結果から明らかなように、広範囲な加熱条件にわたって、濃縮された上澄み液中の7 Sタンパク質の大幅な低減が得られる。

40

【0115】

実施例 3：

この実施例は、実施例 1によって作製されたキャノーラタンパク質単離物についてのタンパク質プロファイルの評価を含む。

【0116】

サイズ排除HPLCを用いて、実施例 1の手順によって作製した濃縮上澄み液および改変された濃縮上澄み液のタンパク質プロファイルを評価した。HPLC分析の前に、噴霧乾燥した生成物を0.1 M NaCl中に1重量%レベルで溶解させた。

50

【 0 1 1 7 】

得られた結果を以下の表 V I に示す。

【 0 1 1 8 】

【 表 6 】

表 V I

バッチ	生成物	%12S	%7S	%2S
SA034-J12-04A	濃縮された上澄み液(C200)	0.00	13.13	86.67
	改変された濃縮上澄み液(C200H)	0.00	3.55	96.45
SA035-J14-04A	濃縮された上澄み液(C200)	0.00	24.52	75.48
	改変された濃縮上澄み液(C200H)	0.00	7.55	92.45

10

【 0 1 1 9 】

表 V I に示した結果から分かるように、濃縮された上澄み液の加熱処理は、そうした加熱処理を行わない場合と比較して、噴霧乾燥キャノーラタンパク質単離物中の 7 S タンパク質の量が大幅に低減された結果となっている。

【 0 1 2 0 】

実施例 4 :

この実施例は実施例 1 で作製したキャノーラタンパク質単離物の溶解性の評価を含む。

【 0 1 2 1 】

実施例 1 の手順によって作製した噴霧乾燥した濃縮上澄み液 (C 2 0 0) および改変された濃縮上澄み液 (C 2 0 0 H) の溶解性を、M o r r らの J . F o o d S c i . 5 0 : 1 7 1 5 ~ 1 7 1 8 頁の手順の修正版を用いて測定した。

20

【 0 1 2 2 】

0 . 5 g のタンパク質を供給するのに十分なタンパク質粉末をビーカーに量りとり、次いで少量の逆浸透 (R O) 精製水を加え、滑らかなペーストが得られるまで混合物を撹拌した。次いで追加の水を加えて容積を約 4 5 m l にした。次いでビーカーの内容物を、磁気撹拌機を用いて 6 0 分間緩やかに撹拌した。タンパク質を分散させた後、直ちに p H を測定し、N a O H または H C l で適切なレベル (4 、 5 、 6 または 7) に調節した。サンプルは p H 調節する前の元の p H でも調製した。p H 調節したサンプルについて、p H を測定し 6 0 分間の撹拌の間に 2 回修正した。6 0 分間の撹拌後、R O 水でサンプルを 5 0 m l の全容積にし、1 重量 / 容積 % のタンパク質分散液を得た。一定分量のタンパク質分散液を、L e c o F A 2 8 窒素測定器 (Nitrogen Determinator) を用いた L e c o 分析によるタンパク質含量測定用に保存した。サンプルの別の取り分を 8 0 0 0 g で 1 0 分間遠心分離機にかけた。これによって未溶解の材料がすべて沈殿し、透明な上澄み液が得られた。次いで上澄み液のタンパク質含量を L e c o 分析で測定した。

30

【 0 1 2 3 】

溶解性 (%) = (上澄み液タンパク質濃度 / 元の分散液のタンパク質濃度) × 1 0 0

得られた結果を以下の表 V I I に示す。

【 0 1 2 4 】

【 表 7 】

表 V I I

バッチ	生成物	溶解度 (%)				
		pH4	pH5	pH6	pH7	元のpH
SA034-J12-04A	濃縮された上澄み液	88.1	100	86.1	97.3	89.8
	改変された濃縮上澄み液	100	100	100	100	100
SA035-J14-04A	濃縮された上澄み液	87.4	95	90.6	90.6	86.7
	改変された濃縮上澄み液	100	100	100	100	100

40

【 0 1 2 5 】

50

表ⅤⅠⅠの結果から分かるように、改変した濃縮上澄み液（Ｃ２００Ｈ）からの乾燥単離物は、濃縮された上澄み液（Ｃ２００）からの乾燥単離物より、様々なｐＨ値で水に著しく可溶性が高い。

【０１２６】

実施例５：

この実施例は、実施例１で作製したキャノーラタンパク質単離物のソフトドリンク中の溶解性の評価を含む。

【０１２７】

実施例１の手順で作製した噴霧乾燥した濃縮上澄み液および改変した濃縮上澄み液のソフトドリンク中での溶解性を、MorrらのJ. Food Sci. 50: 1715~1718頁の手順を修正したものを用いて測定した。

【０１２８】

１．０ｇのタンパク質を供給するのに十分なタンパク質粉末をビーカーに量りとり、次いで少量の無色透明の市販の炭酸ソフトドリンクを加え、その混合物を滑らかなペーストが得られるまで撹拌した。次いでソフトドリンクを追加して容積を約４５ｍｌにした。次いでビーカーの内容物を、磁気撹拌機を用いて６０分間緩やかに撹拌した。６０分間撹拌した後、ソフトドリンクでサンプルを５０ｍｌの全容積にし、２重量／容積％のタンパク質分散液を得た。一定分量のタンパク質分散液をLeco分析によるタンパク質含量測定用に保存した。サンプルの別の取り分を８０００ｇで１０分間遠心分離機にかけた。これによって未溶解の材料がすべて沈殿し、透明な上澄み液が得られた。次いで、上澄み液のタンパク質含量をLeco分析で測定した。

【０１２９】

溶解性（％）＝（上澄み液タンパク質濃度／元の分散液のタンパク質濃度）×１００
得られた結果を以下の表ⅤⅠⅠⅠに示す。

【０１３０】

【表８】

表ⅤⅠⅠⅠ

パッチ	生成物	溶解度(%)
SA034-J12-04A	濃縮された上澄み液	92.3
	改変された濃縮上澄み液	94.9
SA035-J14-04A	濃縮された上澄み液	96.1
	改変された濃縮上澄み液	94.4

【０１３１】

表ⅤⅠⅠⅠの結果から分かるように、改変した濃縮上澄み液（Ｃ２００Ｈ）および濃縮上澄み液（Ｃ２００）からの乾燥単離物はソフトドリンク中で同じような溶解度を有していた。

【０１３２】

しかし、以下の実施例６の結果から分かるように、改変した濃縮上澄み液からの乾燥単離物で調製した溶液の透明度は遥かに優れていた。

【０１３３】

実施例６：

この実施例は、ソフトドリンク中に溶解した、実施例１で作製した噴霧乾燥単離物の溶液中の透明度の評価を含む。

【０１３４】

実施例１で記載のようにして作製した改変した濃縮上澄み液および濃縮上澄み液からの噴霧乾燥単離物ソフトドリンクの溶液中の透明度を測定した。透明度は、無色透明の市販の炭酸ソフトドリンク中の２重量／容積％のタンパク質の溶液で、６００ｎｍで可視光の吸光度を測定することによって評価した。吸光度の読みがより低いほど、より光が透過しており、溶液の透明度はより良好であった。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

得られた結果を以下の表 I X に示す。

【 0 1 3 6 】

【 表 9 】

表 I X

バッチ	生成物	A600
SA034-J12-04A	濃縮された上澄み液	0.544
	改変された濃縮上澄み液	0.150
SA035-J14-04A	濃縮された上澄み液	1.920
	改変された濃縮上澄み液	0.367

10

【 0 1 3 7 】

表 I X に示した結果から分かるように、改変した濃縮上澄み液 (C 2 0 0 H) からの噴霧乾燥した単離物で調製した溶液の透明度は、噴霧乾燥した濃縮上澄み液 (C 2 0 0) から調製したものより遥かに優れていた。

【 0 1 3 8 】

実施例 7 :

この実施例は、本発明の新規なキャノーラタンパク質単離物を生成する代替方法を示す (図 1) 。

20

【 0 1 3 9 】

3 5 0 L 抽出槽中の 0 . 0 5 重量 % アスコルビン酸を含む 1 0 0 L (1 5 重量 / 容積 %) の 0 . 1 5 M 塩化ナトリウム溶液に、周囲温度で 1 5 k g のキャノーラ油糧種子粗粉を加え、この混合物を 3 0 分間攪拌して 2 0 g / L の濃度を有するキャノーラタンパク質溶液を得た。4 0 0 メッシュのバッグを備えたバスケット型遠心分離機を用いてバルク残留粗粉を除去し、分離したバルク粗粉を廃棄した。キャノーラタンパク質溶液を、6 0 0 メッシュのバッグを用いてバスケット型遠心分離機に再度かけて懸濁している微粒子を除去した。2 μ m の濾過充てん物を有するフィルタープレスを用いて、得られたキャノーラタンパク質溶液の仕上げ処理をした (polished) 。

【 0 1 4 0 】

清澄化したキャノーラタンパク質溶液を、周囲温度で 1 0 0 , 0 0 0 ダルトンの分子量カットオフを有する螺旋巻型ポリビニリデンジフルオライド (P V D F) 膜を用いた限外濾過ステップにかけて、7 S および 1 2 S タンパク質を含むキャノーラタンパク質溶液を、4 . 3 L の容積、1 8 8 g / L のタンパク質濃度に濃縮した。限外濾過ステップからの透過液は他の低分子量種と一緒に 2 S タンパク質を含んでいた。

30

【 0 1 4 1 】

次いで、濃縮されたキャノーラタンパク質溶液 (保持液) を、限外濾過用と同じ膜を使用して、0 . 0 5 重量 % のアスコルビン酸を含む 0 . 1 5 M 塩化ナトリウム水溶液を用いてダイアフィルトレーションステップにかけた。透過液が膜から取り出されるのと同じ流速で、ダイアフィルトレーション媒体を残留液に加えた。ダイアフィルトレーションを 5 保持液容のダイアフィルトレーション媒体で実施した。

40

【 0 1 4 2 】

限外濾過およびダイアフィルトレーション操作からの 1 . 2 5 L の分量の残留液を噴霧乾燥して、9 9 . 1 重量 % (N x 6 . 2 5 、窒素値 % は L e c o F P 5 2 8 窒素測定器を用いて測定した) d . b . のタンパク質含量を有し、1 8 . 2 1 重量 % の 2 S タンパク質、7 4 . 5 5 重量 % の 7 S タンパク質および 7 . 2 4 重量 % の 1 2 S タンパク質を含む、大部分が 7 S タンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を得た。

【 0 1 4 3 】

限外濾過およびダイアフィルトレーション操作からの透過液を、5 0 0 0 ダルトンの分子量カットオフを有する螺旋巻型ポリエーテルスルホン (P E S) 膜を用いた限外濾過ス

50

トップにかけて、2 S タンパク質を保持させ、低分子量汚染物質は膜を通して廃棄した。この限外濾過ステップを周囲温度で実施して、第1の限外濾過ステップからの2 S 含有透過液を3 L、125 g/Lのタンパク質濃度まで濃縮した。

【0144】

次いで、濃縮されたキャノーラ2 S タンパク質溶液（保持液）を、濾過した水道水をダイアフィルトレーション媒体として用いて、限外濾過用と同じ膜を用いたダイアフィルトレーションステップにかけた。透過液が膜から取り出されるのと同じ流速で、水を残留液に加えた。ダイアフィルトレーションを5保持液容のダイアフィルトレーション媒体で実施した。

【0145】

ダイアフィルトレーションステップからの残留液を噴霧乾燥して、105.8重量%(N×6.25)d.b.のタンパク質含量を有し、96.7重量%の2 S タンパク質、3.3重量%の7 S タンパク質および0.04重量%の12 S タンパク質を含む、大部分が2 S タンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を得た。

【0146】

実施例8:

この実施例では実施例7の方法を繰り返す。ただし、より大きなスケールで実施する。

【0147】

150 kgのキャノーラ油糧種子粗粉を、10,000 L抽出槽中で、0.05重量%のアスコルビン酸を含む1000 L(15重量/容積%)の0.15 M塩化ナトリウム溶液に周囲温度で加え、混合物を30分間攪拌して、20.7 g/Lの濃度を有するキャノーラタンパク質溶液を得た。バルク残留粗粉を真空ベルトフィルターを用いて除去し、分離した粗粉を廃棄した。ディスク型遠心分離機を用いてキャノーラタンパク質溶液を清澄化し、脱スラッジされた固形分を廃棄した。得られたキャノーラタンパク質溶液を、2 μmの濾過充てん物を有するフィルタープレスを用いて仕上げ処理し、続いて0.2 μmの濾過充てん物を有する別のフィルタープレスで仕上げ処理した。

【0148】

清澄化したキャノーラタンパク質溶液を、100,000ダルトンの分子量カットオフを有する2つの螺旋巻型PVDF膜を用いて限外濾過にかけて、7 S および12 S タンパク質を含むキャノーラタンパク質溶液を41.1 L、221 g/Lのタンパク質濃度に濃縮した。限外濾過ステップからの透過液は他の低分子量種と一緒に2 S タンパク質を含んでいた。

【0149】

限外濾過操作からの3 Lの分量の残留液を噴霧乾燥して、95.1重量%(N×6.25)d.b.のタンパク質含量を有し、26.86重量%の2 S タンパク質、66.22重量%の7 S タンパク質および6.92重量%の12 S タンパク質を含む、大部分が7 S タンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を得た。

【0150】

限外濾過操作からの透過液を、5,000ダルトンの分子量カットオフを有する2つの螺旋巻型PVDF膜を用いた限外濾過ステップにかけて2 S タンパク質を保持させ、低分子量汚染物質を膜通過させて廃棄した。この限外濾過ステップを周囲温度で実施して、第1の限外濾過ステップからの2 S 含有透過液を25 Lに濃縮した。そのタンパク質濃度は24.2 g/Lであった。

【0151】

限外濾過ステップからの残留液を噴霧乾燥して、47.94重量%(N×6.25)d.b.のタンパク質濃度を有し、94.64重量%の2 S タンパク質、5.36重量%の7 S タンパク質および0重量%の12 S タンパク質を含むダイアフィルトレーションされていないキャノーラタンパク質生成物を生成した。

【0152】

後者のキャノーラタンパク質生成物のタンパク質含量が低いのは、塩および他の不純物

10

20

30

40

50

を除去するためのダイアフィルトレーションステップを行っていないためである。後で行ったこの生成物を用いたベンチダイアフィルトレーションでは、ダイアフィルトレーション後のキャノーラタンパク質単離物の生成を示す結果であった。

【0153】

実施例 9 :

この実施例は、実施例 7 の手順によって調製されたキャノーラタンパク質単離物生成物とミセル経路で調製されたキャノーラタンパク質単離物生成物とを比較するものである。

【0154】

実施例 7 で述べた第 1 の限外濾過ステップからの 34 L の分量の残留液を 29.8 に加温し、保持液の容積当たり 10 容の水の比率で温度 3.7 の冷水に注加した。直ちにタンパク質ミセルの白色雲状物が生成した。終夜かけてミセルを会合させ、沈降させた。蓄積されたタンパク質ミセルの集団を上澄み液から分離し、噴霧乾燥して 107.4 重量 % (N x 6.25) d. b. のタンパク質含量を有し、3.80 重量 % の 2 S タンパク質、85.88 重量 % の 7 S タンパク質および 10.32 重量 % の 12 S タンパク質を含むキャノーラタンパク質単離物を得た。

10

【0155】

PMM - 沈降ステップ (365 L) からの上澄み液を 5000 ダルトンの分子量カットオフを有する螺旋巻型 PVDF 膜を用いて限外濾過ステップにかけて、2 S タンパク質および 7 S タンパク質を保持し、低分子量汚染物質を膜通過させて廃棄した。この限外濾過ステップを周囲温度で実施して、上澄み液を 22 L に濃縮した。そのタンパク質濃度は 89.3 g / L であった。

20

【0156】

濃縮上澄み液を噴霧乾燥して、95.51 重量 % (N x 6.25) d. b. のタンパク質含量を有し、84.01 重量 % の 2 S タンパク質、15.51 重量 % の 7 S タンパク質および 0.48 重量 % の 12 S タンパク質を含む、大部分が 2 S タンパク質からなるキャノーラタンパク質単離物を得た。

【0157】

(開示の要約)

本開示を要約すると、2 S タンパク質の含量が増大しており、かつ 7 S タンパク質の含量が減少している新規なキャノーラタンパク質単離物を提供する。これは、透明な水溶液、特にソフトドリンクの製造での有用性を提供するものである。本発明の範囲内の変更形態が可能である。

30

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図 1】タンパク質ミセルプロセス上に載せた本発明の一実施形態によるタンパク質溶液回収プロセスの概略を示す図である。

[illegible]

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2005/000062

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: A23J-1/14, A23J-3/14 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Canadian Patent Database, DELPHION, PlusPat		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No(s).
X	WO 03088760 (LOGIE et al.) 30 October 2003 (2003.10.30) Whole document	1-7
A	MURRAY et al.: "Rapeseed: A Potential Global Source of High Quality Plant Protein" ASIA PACIFIC FOOD INDUSTRY, AP TRADE April 2001 (2001.04) pages 30-34	1-30
A	JP 05043597 A2 (TAKAO) 23 February 1993 (1993.02.23)	1-30
A	WO 02089598 A1 (MURRAY) 14 November 2002 (2002.11.14)	1-30
A	WO 03034836 A1 (HIRON et al.) 1 May 2003 (2003.05.01)	1-30
A	WO 03075673 A1 (HIRON) 18 September 2003 (2003.09.18)	1-30
A	WO 02089597 A1 (BARKER et al.) 14 November 2002 (2002.11.14)	1-30
A	WO 03043439 A1 (BARKER et al.) 30 May 2003 (2003.05.30)	1-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 04 April 2005 (04-04-2005)		Date of mailing of the international search report 30 May 2005 (30-05-2005)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001(819)953-2476		Authorized officer Emman Ben Jamel (819) 934-2330

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2005/000062

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO03088760	30-10-2003	AU2003218931 A1 CA2481936 A1 EP1494541 A1 US2004034200 A1	03-11-2003 30-10-2003 12-01-2005 19-02-2004
JP05043597		NONE	
WO02089598	14-11-2002	BR0209312 A CA2445150 A1 CN1523962 A EP1389921 A1 JP2004519256T T NZ529510 A US2003021884 A1 US2004197378 A1	18-01-2005 14-11-2002 25-08-2004 25-02-2004 02-07-2004 19-12-2003 30-01-2003 07-10-2004
WO03034836		AT249651T T AU696283 B2 AU696983 B2 AU705489 B2 AU719882 B2 AU755678 B2 AU2906695 A AU3134795 A AU5257799 A AU5954496 A AU7859698 A BR0213541 A CA2192326 A1 CA2192329 A1	15-09-2003 03-08-1998 24-09-1998 20-05-1999 18-05-2000 19-12-2002 15-01-1996 15-01-1996 06-04-2000 30-12-1996 01-10-1998 31-08-2004 28-12-1995 28-12-1995
WO03075673	18-09-2003	AU2003208235 A1 BR0308380 A CA2478817 A1 EP1482809 A1 US2003224099 A1	22-09-2003 11-01-2005 18-09-2003 08-12-2004 04-12-2003
WO02089597	14-11-2002	BR0209314 A CA2445147 A1 CN1523961 A EP1389920 A1 JP2004519255T T NZ529509 A US2003125526 A1 US2004254353 A1	18-01-2005 14-11-2002 25-08-2004 25-02-2004 02-07-2004 28-01-2005 03-07-2003 16-12-2004
WO03043439	30-05-2003	AU2002342482 A1 BR0214313 A CA2467746 A1 EP1450621 A1 US2004039174 A1	10-06-2003 03-11-2004 30-05-2003 01-09-2004 26-02-2004

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 シュヴァイツアー、 マーティン

カナダ国 アール2エム 0イー3 マニトバ ウィニペグ ヘイグ アヴェニュー 117

(72)発明者 グリーン、 プレント イー.

カナダ国 アール3エル 1ジー4 マニトバ ウィニペグ ラスガー アヴェニュー 586

(72)発明者 シーガル、 ケヴィン アイ.

カナダ国 アール3エヌ 0アール7 マニトバ ウィニペグ アシュ ストリート 805

(72)発明者 ウィラードセン、 ランディ

アメリカ合衆国 95661 カリフォルニア州 ローズヴィル パーク オーク ドライブ 1933