(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112770637 B
(45)授权公告日 2024.11.08

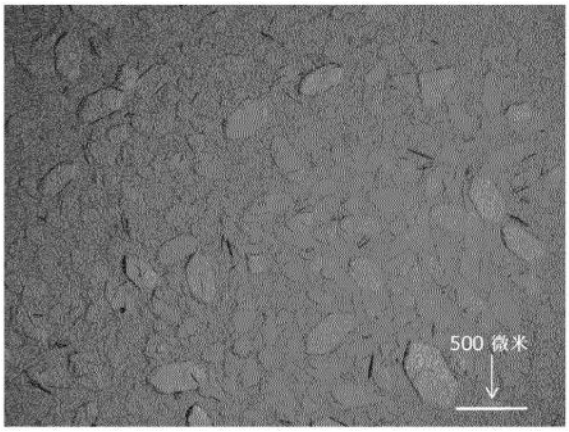
(21)申请号 201980052753.8
(22)申请日 2019.06.26
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112770637 A
(43)申请公布日 2021.05.07
(30)优先权数据
18180224.0 2018.06.27 EP
18180212.5 2018.06.27 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.02.08
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/066990 2019.06.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/002422 EN 2020.01.02
(73)专利权人 阿尔拉食品公司
地址 丹麦维比
(72)发明人 K·B·劳里德森 H·贝特尔森
B·R·帕吉科莱 S·B·尼尔森
T·C·雅格 K·桑德加
G·D·M·马西尔
(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300
专利代理师 杜娟
(51)Int.Cl.
A23C 1/04(2006.01)
A23C 21/00(2006.01)
A23J 1/20(2006.01)
A23L 33/00(2006.01)
A23L 33/19(2006.01)
(56)对比文件
WO 2018115520 A1,2018.06.28
审查员 贾佳
权利要求书5页 说明书47页 附图6页

(54)发明名称

制备富含α-乳白蛋白的组合物、相关产品的新方法及在例如婴儿配方食品中的用途

(57)摘要

本发明涉及一种生产可食用的富含α-乳白蛋白的蛋白质组合物的新方法,该方法基于通过使非聚集BLG选择性结晶而从含乳清蛋白的原料中除去β-乳球蛋白(BLG)。本发明还涉及一种可食用的富含的α-乳白蛋白的新型蛋白质组合物、这些组合物的用途以及包含这些组合物的食物产品。



CN 112770637 B

1.一种制备可食用的富含α-乳白蛋白的乳清蛋白组合物的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

a)提供乳清蛋白溶液,所述乳清蛋白溶液包含非聚集的β-乳球蛋白(BLG)和α-乳白蛋白(ALA),所述乳清蛋白溶液是BLG过饱和的且pH为5~6;

b)在过饱和的乳清蛋白溶液中以盐溶模式结晶非聚集的BLG;以及

c)从剩余的母液中分离BLG晶体,回收至少一些母液;

d)提供第一组合物,所述第一组合物来自回收的母液;

f)干燥:

- 由步骤d)获得的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

2.根据权利要求1所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液进一步包含其他乳清蛋白。

3.根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法进一步包括在步骤d)之后且在步骤f)之前的步骤e):

将所述第一组合物的pH调节至:

i)pH为2.5~4.9;或者

ii)pH为6.1~8.5;以及

在步骤f)中,干燥由步骤e)获得的pH经调节的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

4.根据权利要求2所述的方法,其中,所述方法进一步包括在步骤d)之后且在步骤f)之前的步骤e):

将所述第一组合物的pH调节至:

i)pH为2.5~4.9;或者

ii)pH为6.1~8.5;以及

在步骤f)中,干燥由步骤e)获得的pH经调节的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

5.根据权利要求1或2所述的方法,其中,所述方法还包括物理减少微生物。

6.根据权利要求3或4所述的方法,其中,所述方法还包括物理减少微生物。

7.根据权利要求6所述的方法,其中,所述物理减少微生物在e)的pH调节之后且在步骤f)的干燥之前进行。

8.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多90% w/w的BLG。

9.根据权利要求5所述的方法,其中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多90% w/w的BLG。

10.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液包含奶清蛋白浓缩物、乳清蛋白浓缩物、奶清蛋白分离物和/或乳清蛋白分离物。

11.根据权利要求5所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液包含奶清蛋白浓缩物、乳清蛋白浓缩物、奶清蛋白分离物和/或乳清蛋白分离物。

12.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.3。

13.根据权利要求5所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.3。

14.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液的

UF渗透电导率为至多7 mS/cm。

15. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液的UF渗透电导率为至多7 mS/cm。

16.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,通过对乳清蛋白原料进行一种以上的调节来制备过饱和的乳清蛋白溶液,所述调节包括:

- 调节pH值;
- 降低电导率;
- 降低温度;
- 增加蛋白质浓度;以及
- 添加降低水分活性的试剂。

17.根据权利要求5所述的方法,其中,通过对乳清蛋白原料进行一种以上的调节来制备过饱和的乳清蛋白溶液,所述调节包括:

- 调节pH值;
- 降低电导率;
- 降低温度;
- 增加蛋白质浓度;以及
- 添加降低水分活性的试剂。

18.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少30% w/w。

19.根据权利要求5所述的方法,其中,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少30% w/w。

20.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少40% w/w。

21.根据权利要求5所述的方法,其中,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少40% w/w。

22.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少50% w/w。

23.根据权利要求5所述的方法,其中,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少50% w/w。

24.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,所述第一组合物包含或甚至由回收的母液组成。

25.根据权利要求5所述的方法,其中,所述第一组合物包含或甚至由回收的母液组成。

26.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,所述第一组合物包括或甚至由回收的母液的蛋白质浓缩物组成。

27.根据权利要求5所述的方法,其中,所述第一组合物包括或甚至由回收的母液的蛋白质浓缩物组成。

28.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,提供第一组合物包括进一步富集ALA。

29.根据权利要求5所述的方法,其中,提供第一组合物包括进一步富集ALA。

30.根据权利要求28所述的方法,其中,进行所述进一步富集ALA以获得所述第一组合物,与回收的母液相比,所述第一组合物中ALA相对于蛋白质总量的重量百分比至少高5%。

31.根据权利要求29所述的方法,其中,进行所述进一步富集ALA以获得所述第一组合物,与回收的母液相比,所述第一组合物中ALA相对于蛋白质总量的重量百分比至少高5%。

32.根据权利要求3至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至2.5~4.9。

33.根据权利要求6所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至2.5~4.9。

34.根据权利要求3至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至2.8~4.5。

35.根据权利要求6所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至2.8~4.5。

36.根据权利要求3至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至2.8~3.2。

37.根据权利要求6所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至2.8~3.2。

38.根据权利要求3至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至6.1~8.5。

39.根据权利要求6所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至6.1~8.5。

40.根据权利要求3至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至6.3~8.0。

41.根据权利要求6所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至6.3~8.0。

42.根据权利要求3至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至6.5~7.5。

43.根据权利要求6所述的方法,其中,将所述第一组合物的pH调节至6.5~7.5。

44.根据权利要求5所述的方法,其中,所述物理减少微生物包括以下步骤中的一项以上:

- 热处理;
- 紫外线辐射处理;
- 脉冲光处理;
- 微滤;
- 高压处理;以及
- 超声处理。

45.根据权利要求7所述的方法,其中,所述物理减少微生物包括以下步骤中的一项以上:

- 热处理;
- 紫外线辐射处理;
- 脉冲光处理;
- 微滤;
- 高压处理;以及
- 超声处理。

46.根据权利要求5所述的方法,其中,所述物理减少微生物包括至少巴氏灭菌。

47.根据权利要求7所述的方法,其中,所述物理减少微生物包括至少巴氏灭菌。

48.根据权利要求1至4和权利要求7中任一项所述的方法,其中,相对于第一组合物的蛋白质总量,步骤d)的第一组合物的ALA的重量百分比至少与回收的母液相同。

49.根据权利要求5所述的方法,其中,相对于第一组合物的蛋白质总量,步骤d)的第一组合物的ALA的重量百分比至少与回收的母液相同。

50.可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物,其中,所述组合物可通过权利要求1至49中任一项所述的方法获得,所述组合物包含:

- 相对于蛋白质总量,含量为24~80% w/w的ALA;
- 相对于蛋白质总量,含量为3~14% w/w的免疫球蛋白。

51.根据权利要求50所述的可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物,其中,相对于蛋白质总量,所述组合物进一步包含含量为1~6% w/w的磷脂。

52.根据权利要求50或51所述的可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物,其中,相对于蛋白质总量,所述组合物包含24~70% w/w的ALA。

53.根据权利要求51所述的可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物,其中,相对于蛋白质总量,所述组合物包含含量为2~5% w/w的磷脂。

54.根据权利要求50或51所述的可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物,其中,所述组合物的糠氨酸值为至多50 mg/100 g蛋白质。

55.一种生产食物产品的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

a)提供乳清蛋白溶液,所述乳清蛋白溶液包含非聚集的β-乳球蛋白(BLG)和α-乳白蛋白(ALA),所述乳清蛋白溶液是BLG过饱和的且pH为5~6;

b)在过饱和的乳清蛋白溶液中以盐溶模式结晶非聚集的BLG;以及

c)从剩余的母液中分离BLG晶体,回收至少一些母液;

d)提供第一组合物,所述第一组合物来自回收的母液;

g)将如下组分与一种以上成分混合,并将获得的混合物转换为食物产品:

g1)由步骤d)获得的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

56.根据权利要求55所述的方法,其中,所述乳清蛋白溶液进一步包含其他乳清蛋白。

57.根据权利要求55或56所述的方法,其中,所述方法包括在步骤d)之后且在步骤g)之前的步骤e):

将所述第一组合物的pH调节至:

i)pH为2.5~4.9;或者

ii)pH为6.1~8.5;以及

在步骤g)中,将如下组分与一种以上成分混合并将获得的混合物转换为食物产品:

g1)由步骤d)获得的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物;和/或

g2)由步骤e)获得的pH经调节的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

58.根据权利要求57所述的方法,其中,所述方法包括在步骤e)之后且在步骤g)之前的步骤f):

干燥由步骤d)获得的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物;或者干燥由步骤e)获得的pH经调节的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物;以及

在步骤g)中,将如下组分与一种以上成分混合,并将获得的混合物转换为食物产品:

g1)由步骤d)获得的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物;

g2)由步骤e)获得的pH经调节的所述第一组合物或它的蛋白质浓缩物;和/或

g3)由步骤f)获得的干燥的组合物。

制备富含α-乳白蛋白的组合物、相关产品的新方法及在例如婴儿配方食品中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生产可食用的富含α-乳白蛋白(ALA,alpha-lactalbumin)的蛋白质组合物的新方法,所述方法基于通过使非聚集BLG选择性结晶而从含乳清蛋白(whey protein)的原料(feed)中除去β-乳球蛋白(BLG,beta-lactoglobulin)。本发明还涉及可食用的富含α-乳白蛋白的新型蛋白质组合物、这些组合物的用途以及包含这些组合物的食物产品。

背景技术

[0002] 乳蛋白分级(milk protein fractionation)的概念是本领域众所周知的,其在过去几十年中已发展成用于制备富含各种乳蛋白种类的组合物的一系列技术,乳蛋白各自具有特定的特性和特征。

[0003] 从奶清(milk serum)或乳清(whey)中分离α-乳白蛋白(ALA)是许多出版物的主题,通常涉及多个分离步骤和通常的过滤和/或色谱技术以得到纯化的ALA。

[0004] US 5,008,376描述了使用超滤的ALA分离技术。热沉淀法涉及在给定pH范围内向乳清施加热量,持续足以促进ALA絮凝的时间。此种热沉淀方法描述于US 5,455,331。离子交换方法包括使乳清与阴离子或阳离子交换剂接触,以选择性地保留蛋白质级分。此种方法描述于美国专利号5,077,067。

[0005] Muller等(Lait 83,第439-451页,2003年)描述了通过ALA的特定超滤处理以及可选的可逆沉淀从酸性乳清中富集ALA的方法。例如,通过离心和重新溶解从其他乳清蛋白中分离出ALA沉淀物。

[0006] 在55℃、pH 3.9下保持5至10分钟,获得了良好的沉淀产率。

发明内容

[0007] 偶然地,本发明人出乎意料地发现,通过选择性地结晶BLG并除去BLG晶体可从粗(crude)乳清蛋白溶液中富集ALA。这可在不使用有机溶剂(例如甲苯)的情况下进行。该发现与本领域的公知常识相反,本领域的公知常识教导:蛋白质必须被高度纯化才能使其结晶,并且并非所有蛋白质均可结晶。

[0008] 该发现有可能改变乳制品工业中乳清蛋白的处理和分级方法,并为有效且温和地生产富含ALA的蛋白质组合物打开了大门,例如,这些组合物可安全地用作生产婴儿配方食品(infant formula)产品的食品成分。

[0009] 因此,本发明的一个方面涉及一种制备可食用的富含α-乳白蛋白的乳清蛋白组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0010] a)提供乳清蛋白溶液,所述乳清蛋白溶液包含非聚集的β-乳球蛋白(BLG)、α-乳白蛋白(ALA)和可选的其他乳清蛋白,所述乳清蛋白溶液是BLG过饱和的且pH为5～6;

[0011] b)在过饱和的乳清蛋白溶液中结晶非聚集的BLG,优选以盐溶(salting-in)模式

结晶;以及

[0012] c)从剩余的母液中分离BLG晶体,回收至少一些母液;

[0013] d)提供第一组合物,所述第一组合物来自回收的母液;

[0014] e)可选地,将第一组合物的pH调节至:

[0015] i)pH为2.5～4.9;或者

[0016] ii)pH为6.1～8.5;

[0017] f)干燥:

[0018] -由步骤d)获得的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;或者

[0019] -由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

[0020] 本发明的另一方面涉及可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物,例如,所述组合物可通过本文所述的一种以上方法获得。

[0021] 本发明的又一方面涉及一种生产食物产品的方法,所述方法包括以下步骤:

[0022] a)提供乳清蛋白溶液,所述乳清蛋白溶液包含非聚集的β-乳球蛋白(BLG)、α-乳白蛋白(ALA)和可选的其他乳清蛋白,所述乳清蛋白溶液是BLG过饱和的且pH为5～6;

[0023] b)在过饱和的乳清蛋白溶液中结晶非聚集的BLG,优选以盐溶模式结晶;以及

[0024] c)从剩余的母液中分离BLG晶体,回收至少一些母液;

[0025] d)提供第一组合物,所述第一组合物来自回收的母液;

[0026] e)可选地,将第一组合物的pH调节至:

[0027] i)pH为2.5～4.9;或者

[0028] ii)pH为6.1～8.5;

[0029] f)可选地,干燥由步骤d)获得的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;或者干燥由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;

[0030] g)将如下组分与一种以上成分混合,并将获得的混合物转换为食物产品:

[0031] g1)由步骤d)获得的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;

[0032] g2)由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;和/或

[0033] g3)由步骤f)获得的干燥的组合物。

[0034] 本发明的另一方面涉及食物产品,所述食物产品包含富含ALA的乳清蛋白组合物,所述食物产品可通过例如本文所述的食物产品生产方法获得。

附图说明

[0035] 图1显示了基于甜乳清的粗乳清蛋白溶液(实线)和结晶后所得母液(虚线)的两个叠加色谱图;实线和虚线之间的差异是由于除去了BLG晶体。

[0036] 图2是由实施例2回收的BLG晶体的显微镜照片;

[0037] 图3由从实施例2回收的BLG晶体的色谱图;

[0038] 图4显示了实施例3的原料(实线)以及结晶和除去BLG晶体之后获得的母液(虚线)的色谱图;

[0039] 图5显示了实施例5的原料3在结晶之前(左图)和之后(右图)的图;

[0040] 图6是实施例6的结晶工艺变体的示意图,其使用DCF从母液中分离BLG晶体。

具体实施方式

[0041] 定义

[0042] 在本发明的上下文中,术语“β-乳球蛋白”或“BLG”涉及来自哺乳动物物种的β-乳球蛋白,例如以天然、展开和/或糖基化的形式存在,包括自然发生的基因变体。该术语还包括聚集的BLG、沉淀的BLG和结晶的BLG。当涉及BLG的量时,其是指BLG总量(包括聚集BLG)。BLG的总量根据实施例1.21测定。术语“聚集的BLG”是指如下的BLG:该BLG是至少部分展开的且通常通过疏水相互作用和/或共价键与其他变性BLG分子和/或其他变性乳清蛋白聚集。

[0043] BLG是牛乳清和牛奶清中最主要的蛋白质,存在几种基因变体,牛奶中的主要变体被标记为A和B。BLG是一种脂蛋白,可结合多种疏水分子,体现了在它们的运输中的作用。还显示,BLG能够通过铁载体(siderophore)结合铁,可能在对抗病原体中起作用。人类母乳中缺少BLG的同源物(homologue)。

[0044] 牛BLG是一种相对较小的蛋白质,具有约162个氨基酸残基,分子量为约18.3kDa至18.4kDa。如使用核磁共振波谱法测得的,在生理条件下,其主要为二聚体,但在低于约3的pH下解离为单体,保留其天然状态。不过,BLG在各种自然条件下也以四聚体、八聚体和其他多聚体的形式存在。

[0045] 在本发明的上下文中,术语“非聚集的β-乳球蛋白”或“非聚集的BLG”还涉及来自哺乳动物物种的β-乳球蛋白,例如以天然、展开和/或糖基化的形式存在,包括自然发生的基因变体。然而,该术语不包括聚集的BLG、沉淀的BLG或结晶的BLG。根据实施例1.2测得非聚集BLG的量或浓度。

[0046] 通过计算$(m_{总BLG}-m_{非聚集BLG})/m_{总BLG}*100\%$,来确定非聚集BLG相对于总BLG的百分比。$m_{总BLG}$为根据实施例1.21测得的BLG的浓度或量,$m_{非聚集BLG}$为根据实施例1.2测得的非聚集BLG的浓度或量。

[0047] 在本发明的上下文中,术语“晶体”涉及固体材料,所述固体材料的成分(例如原子、分子或离子)以高度有序的微观结构排列,形成在所有方向上延伸的晶格。

[0048] 在本发明的上下文中,术语“BLG晶体”涉及蛋白质晶体,所述蛋白质晶体主要包含以高度有序的微观结构排列的非聚集BLG(优选天然BLG),形成在所有方向上延伸的晶格。例如,BLG晶体可以为单片或多晶的,可以为例如完整晶体、晶体碎片或它们的组合。例如,在加工期间对完整晶体进行机械剪切时,形成晶体碎片。晶体碎片也具有晶体的高度有序的微观结构,但可能缺少完整晶体的均匀表面和/或均匀边缘或角。例如,参见PCT申请号PCT/EP2017/084553的图18作为许多完整BLG晶体的实例,PCT申请号PCT/EP2017/084553的图13作为BLG晶体碎片的实例。在这两种情况下,BLG晶体或晶体碎片均可使用光学显微镜在视觉上被识别为轮廓分明、紧凑且拟序结构。通常,BLG晶体或晶体碎片至少部分透明。此外,已知蛋白质晶体是双折射的,该光学性质可用于鉴定具有晶体结构的未知颗粒。另一方面,非结晶BLG聚集体通常表现为边界不清晰、不透明且大小不规则的开放或多孔块状物。

[0049] 在本发明的上下文中,术语“结晶”涉及蛋白质晶体的形成。例如,结晶自发地发生或通过添加晶种来引发。

[0050] “母液(mother liquor)”

[0051] 在本发明的上下文中,术语“母液”涉及在已结晶BLG且已至少部分地去除BLG晶体

之后剩余的乳清蛋白溶液。母液可能仍包含一些BLG晶体,但通常仅包含逃脱分离的小BLG晶体。

[0052] 在本发明的上下文中,术语“可食用的组合物”涉及可安全用于人类食用和用作食品成分且不包含有问题的有毒组分(例如甲苯或其他有害有机物溶剂)的组合物。

[0053] 在本发明的上下文中,术语“ALA”或“α-乳白蛋白”涉及来自哺乳动物物种的α-乳清蛋白,例如以天然和/或糖基化的形式存在,包括自然发生的基因变体。该术语还包括聚集的ALA和沉淀的BLG。当涉及ALA的量时,其是指ALA(包括例如聚集ALA)的总量。根据实施例1.21测定ALA的总量。术语“聚集的ALA”涉及如下的ALA:该ALA通常是至少部分展开的且通常通过疏水相互作用和/或共价键与其他变性ALA分子和/或其他变性乳清蛋白聚集。

[0054] α-乳白蛋白(ALA)是几乎所有哺乳动物物种的乳汁中均存在的蛋白质。ALA形成乳糖合成酶(LS)异二聚体的调节亚基,而β-1,4-半乳糖基转移酶(β4Gal-T1)形成催化组分。共同地,这些蛋白质使得LS可以通过将半乳糖部分转移至葡萄糖来产生乳糖。β-乳球蛋白的主要结构差异之一是,ALA没有可作为共价聚集反应起点的任何游离硫醇基团。

[0055] 在本发明的上下文中,术语“非聚集ALA”还涉及来自哺乳动物物种的ALA,例如以天然、展开和/或糖基化的形式存在,包括自然发生的基因变体。然而,该术语不包括聚集的ALA或沉淀的ALA。根据实施例1.2测定非聚集BLG的量或浓度。

[0056] 通过计算$(m_{总ALA}-m_{非聚集ALA})/m_{总ALA}*100\%$,来确定非聚集ALA相对于总ALA的百分比。$m_{总ALA}$为根据实施例1.21测得的ALA的浓度或量,$m_{非聚集ALA}$为根据实施例1.2测得的非聚集ALA的浓度或量。

[0057] 在本发明的上下文中,与衍生该组合物的原料相比,“富集ALA的”或“ALA富集的”组合物具有更高的相对于蛋白质总量的ALA重量百分比。

[0058] 在本发明的上下文中,术语“酪蛋白巨肽(caseinomacropeptide)”或“CMP”涉及亲水性肽,残基106-169,源于通过天冬氨酸蛋白酶(例如凝乳酶)水解哺乳动物物种的“κ-CN”或“κ-酪蛋白”,例如以天然和/或糖基化的形式,包括自然发生的基因变体。

[0059] 术语“乳清”涉及牛奶中的酪蛋白沉淀并被除去之后剩余的液相。例如,通过酸化牛奶和/或使用凝乳酶来沉淀酪蛋白。存在几种类型的乳清,例如“甜乳清”和“酸乳清”,“甜乳清”是基于凝乳酶沉淀酪蛋白而产生的乳清产物,“酸性乳清”或“酸乳清”是基于酸沉淀酪蛋白而产生的乳清产物。例如,通过添加食用酸或通过细菌培养来基于酸沉淀酪蛋白。

[0060] 术语“奶清”涉及当通过例如微滤或大孔超滤从牛奶中除去酪蛋白和乳脂小球时剩余的液体。奶清也可称为“理想乳清”。

[0061] 术语“奶清蛋白质”或“血清蛋白质”涉及奶清中存在的蛋白质。

[0062] 在本发明的上下文中,术语“乳清蛋白质”涉及乳清或奶清中发现的蛋白质。乳清蛋白质可以为乳清或奶清中发现的蛋白质种类的子集,甚至是单个乳清蛋白种类,或者它可以为在乳清或/和奶清中发现的蛋白质种类的完整集合。

[0063] 术语“酪蛋白”涉及乳汁中发现的酪蛋白,包括生乳汁中发现的两种天然胶束酪蛋白,单个酪蛋白种类和酪蛋白酸盐。

[0064] 在本发明的上下文中,“过饱和”或“BLG过饱和”的液体包含的溶解的非聚集BLG的浓度高于在给定物理和化学条件下液体中非聚集BLG的饱和点。术语“过饱和”在结晶领域是众所周知的(例如参见Gérard Coquerela,Crystallization of molecular systems

from solution:phase diagrams,supersaturation and other basic concepts, Chemical Society Reviews 2014,第2286-2300页,第7期),可通过多种不同的测量技术来测定过饱和(例如通过光谱学或粒径分析)。在本发明的上下文中,BLG的过饱和通过以下程序测定。

[0065] 检测在特定条件下液体中BLG是否过饱和的程序:

[0066] a)将50mL待测液体样品转移到高度115mm、内径25mm、容量50mL的离心管(VWR目录号525-0402)中。在步骤a)至h)期间,应注意将样品及其后续级分保持在液体的原始物理和化学条件下;

[0067] b)立即将样品以3000g离心3.0分钟,加速至多30秒,减速至多30秒;

[0068] c)离心后,立即将尽可能多的上清液转移至(与步骤a中相同类型的)第二个离心管中(如果已形成沉淀物,请勿扰动沉淀物);

[0069] d)取0.05mL上清液的子样品(子样品A);

[0070] e)将粒径至多为200μm的10mg BLG晶体(相对于总固体,纯度为至少98%的非聚集BLG)加入到第二个离心管中,搅拌混合物;

[0071] f)使第二个离心管在原始温度下放置60分钟;

[0072] g)在步骤f)之后,立即将第二个离心管以500g离心10分钟,然后取另外0.05mL上清液的子样品(子样品B);

[0073] h)回收步骤g)的离心沉淀物(如果有),将其重悬于MilliQ水中,立即检查悬浮液中是否存在可通过显微镜观察到的晶体;

[0074] i)使用实施例1.2中概述的方法测定子样品A和B中非聚集BLG的浓度-结果表示为BLG相对于子样品总重量的%w/w。子样品A的非聚集BLG的浓度被称为$C_{BLG,A}$,子样品B的非聚集BLG的浓度被称为$C_{BLG,B}$;

[0075] j)如果$C_{BLG,B}$低于$C_{BLG,A}$且步骤i)中观察到晶体,则从中取得步骤a)的样品的液体(在特定条件下)是过饱和的。

[0076] 在本发明的上下文中,术语“液体”和“溶液”包括:不含颗粒物质的组合物,以及包含液体与固体和/或半固体颗粒(例如蛋白质晶体或其他蛋白质颗粒)的组合的组合物。因此,“液体”或“溶液”可以为悬浮液甚至为浆液。但是,“液体”和“溶液”优选可泵送。

[0077] 在本发明的上下文中,术语“乳清蛋白浓缩物”(WPC)和“血清蛋白浓缩物”(SPC)涉及干燥组合物或含水组合物,其包含总量相对于固体总量为20~89%w/w的蛋白质。

[0078] 优选地,WPC或SPC包含:

[0079] 相对于固体总量,20~89%w/w的蛋白质;

[0080] 相对于蛋白质总量,15~70%w/w的非聚集BLG;

[0081] 相对于蛋白质总量,8~50%w/w的ALA;以及

[0082] 相对于蛋白质,0~40%w/w的CMP。

[0083] 或者,但也优选地,WPC或SPC可包含:

[0084] 相对于固体总量,20~89%w/w的蛋白质;

[0085] 相对于蛋白质总量,15~90%w/w的非聚集BLG;

[0086] 相对于蛋白质总量,4~50%w/w的ALA;以及

[0087] 相对于蛋白质,0~40%w/w的CMP。

[0088] 优选地,WPC或SPC包含:

[0089] 相对于固体总量,20～89%w/w的蛋白质;

[0090] 相对于蛋白质总量,15～80%w/w的非聚集BLG;

[0091] 相对于蛋白质总量,4～50%w/w的ALA;以及

[0092] 相对于蛋白质,0～40%w/w的CMP。

[0093] 更优选地,WPC或SPC包含:

[0094] 相对于固体总量,70～89%w/w的蛋白质;

[0095] 相对于蛋白质总量,30～90%w/w的非聚集BLG;

[0096] 相对于蛋白质总量,4～35%w/w的ALA;以及

[0097] 相对于蛋白质,0～25%w/w的CMP。

[0098] 通常,SPC不包含CMP或仅包含痕量的CMP。

[0099] 术语“乳清蛋白分离物”(WPI)和“血清蛋白分离物”(SPI)涉及干燥组合物或含水组合物,其包含总量相对于固体总量为90～100%w/w的蛋白质。

[0100] 优选地,WPI或SPI包含:

[0101] 相对于固体总量,90～100%w/w的蛋白质;

[0102] 相对于蛋白质总量,15～70%w/w的非聚集BLG;

[0103] 相对于蛋白质总量,8～50%w/w的ALA;以及

[0104] 相对于蛋白质总量,0～40%w/w的CMP。

[0105] 或者,但也优选地,WPI或SPI可包含:

[0106] 相对于固体总量,90～100%w/w的蛋白质;

[0107] 相对于蛋白质总量,30～95%w/w的非聚集BLG;

[0108] 相对于蛋白质总量,4～35%w/w的ALA;以及

[0109] 相对于蛋白质总量,0～25%w/w的CMP。

[0110] 优选地,WPI或SPI包含:

[0111] 相对于固体总量,90～100%w/w的蛋白质;

[0112] 相对于蛋白质总量,30～90%w/w的非聚集BLG;

[0113] 相对于蛋白质总量,4～35%w/w的ALA;以及

[0114] 相对于蛋白质总量,0～25%w/w的CMP。

[0115] 通常,SPI不包含CMP或仅包含痕量的CMP。

[0116] 术语“基本上由…组成”和“基本由…组成”指所述权利要求书或特征涵盖所指定的材料或步骤以及那些不会实质性地影响所要求保护的发明的基本特征和新颖特征的材料或步骤。

[0117] 在本发明的上下文中,词组“Y和/或X”表示“Y”或“X”或“Y和X”。按照相同的逻辑,词组“n_1、n_2、...、n_{i-1}和/或n_i”是指“n_1”或“n_2”或...或“n_{i-1}”或“n_i”或组分n_1、n_2、...、n_{i-1}和n_i的任意组合。

[0118] 在本发明的上下文中,术语“干燥”指所述组合物或产品包含至多10%w/w、优选至多6%w/w、更优选甚至更少的水。

[0119] 在本发明的上下文中,术语“物理减少微生物(physical microbial reduction)”涉及与组合物的物理相互作用,导致组合物的活微生物的总量减少。该术语不包括添加杀

死微生物的化学物质。此外,该术语不包括液体的雾化液滴在喷雾干燥期间的热暴露,但包括在喷雾干燥之前的可能的预热。

[0120] 在本发明的上下文中,粉末的pH指混合到90g脱盐水(demineralised water)中的10g粉末的pH,根据实施例1.8进行测量。

[0121] 在本发明的上下文中,除非具体提到另一参考物(例如固体总量或蛋白质总量),某种组合物、产物或材料的组分的重量百分比(%w/w)指该组分相对于特定组合物、产物或材料的重量百分比。

[0122] 在本发明的上下文中,组分X和组分Y之间的术语"重量比"指通过计算m_X/m_Y获得的值,其中,m_X为组分X的量(重量),m_Y为组分Y的量(重量)。

[0123] 在本发明的上下文中,术语"至少巴氏灭菌"涉及具有等于或高于在70℃热处理10秒的微生物杀灭作用的热处理。测定细菌杀灭作用的参考为大肠杆菌O157:H7。

[0124] 在本发明的上下文中,术语"乳清蛋白溶液"用于描述特殊的含水乳清蛋白组合物,该水性乳清蛋白组合物的BLG以盐溶模式过饱和且可用于制备BLG晶体。

[0125] 在本发明的上下文中,术语"乳清蛋白原料"涉及乳清蛋白溶液的来源。通常,乳清蛋白原料为WPC、WPI、SPC或SPI。

[0126] 在本发明的上下文中,术语"无菌"指所述无菌组合物或产品不包含任何活的微生物,因此在室温下储存期间没有微生物的生长。已灭菌的组合物是无菌的。

[0127] 当液体(例如饮料制剂)被灭菌并被无菌包装在无菌容器中时,该液体在室温下通常具有至少六个月的保质期。灭菌处理可杀死可能引起液体变质的孢子和微生物。

[0128] 在本发明的上下文中,术语"蛋白质级分"涉及所述组合物的蛋白质,例如粉末或饮料制剂中的蛋白质。

[0129] 在本发明的上下文中,除非另有说明,否则本文所用的术语"矿物质"指常量矿物质(major minerals)、痕量或微量矿物质、其他矿物质及它们的组合中的任一种。常量矿物质包括:钙、磷、钾、硫、钠、氯、镁。痕量或微量矿物质包括:铁、钴、铜、锌、钼、碘、硒、锰。其他矿物质包括:铬、氟、硼、锂和锶。

[0130] 在本发明的上下文中,除非另有说明,否则本文所用的术语"脂质"、"脂肪"和"油"可互换使用,指源自植物或动物或由加工植物或动物得到的脂质材料。这些术语还包括合成脂质材料,只要此种合成材料适合人类食用即可。

[0131] 在本发明的上下文中,术语"透明的"涵盖具有视觉上澄清外观、且允许光通过并穿过其而出现不同图像的饮料制剂。透明饮料的浊度为至多200NTU。

[0132] 在本发明的上下文中,术语"不透明的"涵盖具有视觉上不澄清外观且浊度大于200NTU的饮料制剂。

[0133] 在本发明的上下文中,第一溶液的"蛋白质浓缩物"或"其蛋白质浓缩物"涉及第二溶液,与第一溶液相比,所述第二溶液具有:i)以固体总量为基准计,更高重量百分比的蛋白质总量;和/或ii)以总重量为基准计,更高重量百分比的蛋白质总量。例如,蛋白质浓缩物可通过仅除去第一溶液中的水和/或除去非蛋白质固体(例如碳水化合物和盐)而获得。优选地,蛋白质浓缩物具有与第一溶液基本相同的pH;即,蛋白质浓缩物的pH优选比第一溶液的pH高或低至多0.3,更优选比第一溶液的pH高或低至多0.2,甚至更优选比第一溶液的pH高或低至多0.1。

[0134] 在本发明的上下文中,术语“其他蛋白质”指非BLG或ALA的蛋白质。通常,乳清蛋白溶液中存在的其他蛋白质包含奶清或乳清中发现的一种或多种非BLG/ALA蛋白。此类蛋白质的非限制性实例为:牛血清白蛋白、免疫球蛋白、酪蛋白巨肽(CMP)、骨桥蛋白、乳铁蛋白和乳脂球膜蛋白。

[0135] 因此,优选地,乳清蛋白溶液可包含至少一种选自下组的其他乳清蛋白:牛血清白蛋白、免疫球蛋白、酪蛋白巨肽(CMP)、骨桥蛋白、乳铁蛋白、乳脂球膜蛋白及它们的组合。

[0136] 在本发明的上下文中,术语“母液”涉及在非聚集BLG已结晶且BLG晶体已被至少部分除去之后剩余的乳清蛋白溶液。母液可能仍包含一些BLG晶体,但通常仅包含逃脱分离的小BLG晶体。

[0137] 如上所述,本发明的一个方面涉及一种制备可食用的富含α-乳白蛋白的乳清蛋白组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

[0138] a)提供乳清蛋白溶液,所述乳清蛋白溶液包含非聚集的BLG、ALA和可选的其他乳清蛋白,所述乳清蛋白溶液是BLG过饱和的且pH为5~6;

[0139] b)在过饱和的乳清蛋白溶液中结晶非聚集的BLG,优选以盐溶模式结晶;以及

[0140] c)从剩余的母液中分离BLG晶体,回收至少一些母液;

[0141] d)提供第一组合物,所述第一组合物来自回收的母液和可选的用过的洗涤液;

[0142] e)可选地,将第一组合物的pH调节至:

[0143] i)pH为2.5~4.9;或者

[0144] ii)pH为6.1~8.5;

[0145] f)干燥:

[0146] -由步骤d)获得的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;或者

[0147] -由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

[0148] 在本发明的一些优选实施方式中,所述方法还包括物理减少微生物,优选在步骤e)的pH调节之后且在步骤f)的干燥之前进行。

[0149] 如上所述,本发明的步骤a)涉及提供乳清蛋白溶液,所述乳清蛋白溶液包含非聚集的BLG、ALA和至少一种其他乳清蛋白。

[0150] 在本发明的一些实施方式中,相对于蛋白质总量,乳清蛋白溶液包含至多10%w/w、优选至多5%w/w、更优选至多1%w/w、甚至优选至多0.5%w/w的酪蛋白。在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液不包含任何可检测量的酪蛋白。

[0151] 在本发明的一些优选实施方式中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少5%w/w的其他乳清蛋白。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少10%w/w的其他乳清蛋白。更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少15%w/w的其他乳清蛋白。甚至更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少20%w/w的其他乳清蛋白。最优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少30%w/w的其他乳清蛋白。

[0152] 在本发明的其他优选实施方式中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少1%w/w的其他乳清蛋白。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少2%w/w的其他乳清蛋白。甚至更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少3%w/w的其他乳清蛋白。最优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含

至少4％w/w的其他乳清蛋白。

[0153] 在本发明的其他优选实施方式中，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少35％w/w的其他乳清蛋白。优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少40％w/w的其他乳清蛋白。更优选地，例如，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少45％w/w的其他乳清蛋白。甚至更优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少50％w/w的其他乳清蛋白。

[0154] 在本发明的一些优选实施方式中，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含5～90％w/w的其他乳清蛋白。优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含10～80％w/w的其他乳清蛋白。例如，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含乳清蛋白包含例如20～70％w/w的其他乳清蛋白。优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含30～70％w/w的其他乳清蛋白。

[0155] 如上所述，本发明人发现可以在不使用有机溶剂的情况下使非聚集BLG结晶。此种纯化方法也可用于精制含有乳清蛋白的制剂，这些制剂已进行了一些BLG纯化；此种纯化方法提供了进一步提高非聚集BLG纯度的简单方法。因此，在本发明的一些优选实施方式中，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含1～20％w/w的其他乳清蛋白。优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含2～15％w/w的其他乳清蛋白。甚至更优选地，例如，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含3～10％w/w的其他乳清蛋白。

[0156] 在本发明的一些实施方式中，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少5％w/w的ALA。优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少10％w/w的ALA。甚至更优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少15％w/w的ALA。或者，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少20％w/w的ALA。

[0157] 在本发明的一些优选实施方式中，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少25％w/w的ALA。优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少30％w/w的ALA。相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液优选包含至少35％w/w的ALA。甚至更优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少40％w/w的ALA。

[0158] 在本发明的一些优选实施方式中，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含5～95％w/w的ALA。优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液包含5～70％w/w的ALA。甚至更优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含10～60％w/w的ALA。相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液优选包含12～50％w/w的ALA。甚至更优选地，相对于蛋白质总量，步骤a)的乳清蛋白溶液可包含20～45％w/w的ALA。

[0159] 通常优选地，本文所述的组合物和产品中的至少一些ALA包含至少一些非聚集ALA。优选地，至少25％的ALA为非聚集ALA。更优选地，至少至少50％的ALA为非聚集ALA。甚至更优选地，至少70％的ALA为非聚集ALA。最优选地，至少90％的ALA为非聚集ALA。甚至更优选地，约100％的ALA可以为非聚集的ALA。

[0160] 在本发明的一些优选实施方式中，步骤a)的乳清蛋白溶液中非聚集BLG与ALA之间的重量比为至少0.01。优选地，步骤a)的乳清蛋白溶液中非聚集BLG与ALA之间的重量比为至少0.5。甚至更优选地，步骤a)的乳清蛋白溶液中非聚集BLG与ALA之间的重量比为至少1，例如为至少2。例如，步骤a)的乳清蛋白溶液中非聚集BLG与ALA之间的重量比可以为至少3。乳清蛋白溶液和乳清蛋白原料中非聚集BLG和其他蛋白质的量和浓度均指溶解的蛋白，不

包括沉淀或结晶的蛋白。

[0161] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤a)的乳清蛋白溶液中非聚集BLG与ALA之间的重量比为0.01～20。优选地,步骤a)的乳清蛋白溶液的非聚集BLG和ALA之间的重量比为0.2～10。甚至更优选地,步骤a)的乳清蛋白溶液中非聚集BLG与ALA之间的重量比为0.5～4。例如,步骤a)的乳清蛋白溶液中非聚集BLG与ALA之间的重量比可以为1～3。

[0162] 在本发明的一些优选实施方式中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少1%w/w的非聚集BLG。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少2%w/w的非聚集BLG。甚至更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少5%w/w的非聚集BLG。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少10%w/w的非聚集BLG。

[0163] 在本发明的一些优选实施方式中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少12%w/w的非聚集BLG。例如,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少15%w/w的非聚集BLG。例如,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少20%w/w的非聚集BLG。或者,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至少30%w/w的非聚集BLG。

[0164] 在本发明的一些特别优选实施方式中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多95%w/w的非聚集BLG。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至多90%w/w的非聚集BLG。更优选地,例如,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至多85%w/w的非聚集BLG。甚至更优选地,例如,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至多80%w/w的非聚集BLG。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至多78%w/w的非聚集BLG。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含至多75%w/w的非聚集BLG。

[0165] 在本发明的一些优选实施方式中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含1～95%w/w的非聚集BLG。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含5～90%w/w的非聚集BLG。更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含10～85%w/w的非聚集BLG。甚至更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含10～80%w/w的非聚集BLG。最优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含20～70%w/w的非聚集BLG。

[0166] 在本发明的其他优选实施方式中,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含10～95%w/w的非聚集BLG。优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含12～90%w/w的非聚集BLG。更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含15～85%w/w的非聚集BLG。甚至更优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含15～80%w/w的非聚集BLG。最优选地,相对于蛋白质总量,步骤a)的乳清蛋白溶液可包含30～70%w/w的非聚集BLG。

[0167] 在本发明的一些优选实施方式中,相对于乳清蛋白溶液的重量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至少0.4%w/w的非聚集BLG。优选地,乳清蛋白溶液包含至少1.0%w/w的非聚集BLG。更优选地,乳清蛋白溶液包含至少2.0%w/w的非聚集BLG。甚至更优选地,乳清蛋白溶液包含至少4%w/w的非聚集BLG。

[0168] 更高浓度的非聚集BLG是甚至更优选的。优选地,乳清蛋白溶液包含至少6%w/w的

非聚集BLG。更优选地,乳清蛋白溶液包含至少10%w/w的非聚集BLG。甚至更优选地,乳清蛋白溶液包含至少15%w/w的非聚集BLG。

[0169] 在本发明的一些优选实施方式中,相对于乳清蛋白溶液的重量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含0.4~40%w/w的非聚集BLG。优选地,乳清蛋白溶液包含1~35%w/w的非聚集BLG。更优选地,乳清蛋白溶液包含4~30%w/w的非聚集BLG。甚至更优选地,乳清蛋白溶液包含10~25%w/w的非聚集BLG。

[0170] 任何合适的乳清蛋白来源均可用于制备乳清蛋白溶液。在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液包含奶清蛋白浓缩物、乳清蛋白浓缩物、奶清蛋白分离物、乳清蛋白分离物或它们的组合,或者甚至由其组成。

[0171] 优选地,乳清蛋白溶液为脱盐(demineralised)的乳清蛋白溶液。

[0172] 在本文中,术语"脱盐"指乳清蛋白溶液的电导率为至多15mS/cm,优选为至多10mS/cm,甚至更优选为至多8mS/cm。脱盐的乳清蛋白溶液的UF渗透电导率(permeate conductivity)优选为至多7mS/cm,更优选为至多4mS/cm,甚至更优选为至多1mS/cm。

[0173] 特别优选地,乳清蛋白溶液为脱盐奶清蛋白浓缩物、脱盐奶清蛋白分离物、脱盐乳清蛋白浓缩物或脱盐乳清蛋白分离物。

[0174] 在本发明的一些特别优选实施方式中,乳清蛋白溶液包括或甚至由以下组分组成:脱盐和pH经调节的奶清蛋白浓缩物、乳清蛋白浓缩物、奶清蛋白分离物、乳清蛋白分离物或它们的组合。

[0175] 例如,乳清蛋白溶液可包含脱盐的乳清蛋白浓缩物,或者甚至由其组成。或者,乳清蛋白溶液可包含脱盐的奶清蛋白浓缩物,或者甚至由其组成。或者,乳清蛋白溶液可包含脱盐的奶清蛋白分离物,或者甚至由其组成。或者,乳清蛋白溶液可包含脱盐的乳清蛋白分离物,或者甚至由其组成。

[0176] 优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质源自哺乳动物的乳汁,优选源自反刍动物(例如奶牛、绵羊、山羊、水牛、骆驼、美洲驼、母马和/或鹿)的乳汁。源自牛(奶牛)乳的蛋白质是特别优选的。因此,BLG和其他乳清蛋白优选为牛BLG和牛乳清蛋白。

[0177] 优选地,乳清蛋白溶液中的蛋白尽可能接近其天然状态,优选仅经过温和热处理(如果有)。

[0178] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液中非聚集BLG的乳糖基化度(degree of lactosylation)为至多1。优选地,乳清蛋白溶液中非聚集BLG的乳糖基化度为至多0.6。更优选地,乳清蛋白溶液中非聚集BLG的乳糖基化度为至多0.4。甚至更优选地,乳清蛋白溶液中非聚集BLG的乳糖基化度为至多0.2。最优选地,乳清蛋白溶液中非聚集BLG的乳糖基化度为至多0.1,例如优选为至多0.01。

[0179] 根据Czerwenka等(J.Agric.Food Chem.2006,54(23):8874-8882)测定BLG的乳糖基化度。

[0180] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的糠氨酸值(furosine value)为至多80mg/100g蛋白质。优选地,乳清蛋白溶液的糠氨酸值为至多40mg/100g蛋白质。更优选地,乳清蛋白溶液的糠氨酸值为至多20mg/100g蛋白质。甚至更优选地,乳清蛋白溶液的糠氨酸值为至多10mg/100g蛋白质。最优选地,乳清蛋白溶液的糠氨酸值为至多5mg/100g蛋白质,例如,糠氨酸值优选为0mg/100g蛋白质。

[0181] 通常,除蛋白质以外,乳清蛋白溶液还包含其他成分。乳清蛋白溶液可包含通常发现于乳清或奶清中的其他成分,例如矿物质、碳水化合物和/或脂质。替代地或另外地,乳清蛋白溶液可包含对于乳清或奶清而言为非天然的成分。然而,优选地,此种非天然成分应可安全用于食物产品生产中,优选还可安全用于人类食用。

[0182] 本发明的方法特别有利于从粗乳清蛋白溶液中分离出非聚集BLG,所述粗乳清蛋白溶液含有除非聚集BLG以外的其他固体。

[0183] 例如,乳清蛋白溶液可包含碳水化合物,例如乳糖、寡糖和/或乳糖的水解产物(即葡萄糖和半乳糖)。例如,乳清蛋白溶液可包含0～40%w/w(例如1～30%w/w或2～20%w/w)的碳水化合物。

[0184] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液包含至多20%w/w的碳水化合物,优选至多10%w/w的碳水化合物,更优选至多5%w/w的碳水化合物,甚至更优选至多2%w/w的碳水化合物。

[0185] 乳清蛋白溶液还可包含脂质,例如以甘油三酯和/或其他脂质类型(例如磷脂)的形式存在的脂质。

[0186] 在本发明的一些实施方式中,相对于固体总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多15%w/w的脂质总量。优选地,相对于固体总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多10%w/w的脂质总量。更优选地,相对于固体总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多6%w/w的脂质总量。甚至更优选地,相对于固体总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多1.0%w/w的脂质总量。最优选地,相对于固体总量,步骤a)的乳清蛋白溶液包含至多0.5%w/w的脂质总量。

[0187] 通常,相对于乳清蛋白溶液的重量,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为至少1%w/w。优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为至少5%w/w。更优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为至少10%w/w。甚至更优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为至少15%w/w。

[0188] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为1～50%w/w。优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为5～40%w/w。更优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为10～30%w/w。甚至更优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质总量为15～25%w/w。

[0189] 根据实施例1.1测定乳清蛋白溶液的蛋白质总量。

[0190] 通常,通过对乳清蛋白原料进行一种以上调节来制备乳清蛋白溶液,所述调节形成BLG过饱和的乳清蛋白溶液。

[0191] 优选地,原料为WPC、WPI、SPC、SPI或它们的组合。

[0192] 在本发明的上下文中,术语“乳清蛋白原料”涉及被转化为BLG过饱和的乳清蛋白溶液的组合物。通常,乳清蛋白原料为包含非聚集BLG、ALA和至少一种其他乳清蛋白的水溶液,但通常是BLG不饱和的。

[0193] 关于乳清蛋白溶液的化学组成的实施方式同样适用于乳清蛋白原料。然而,通常,乳清蛋白原料的至少一个参数被设定为避免过饱和或至少自发结晶。

[0194] 在本发明的一些优选实施方式中,通过对乳清蛋白原料进行一种以上的调节来制备过饱和的乳清蛋白溶液,所述调节包括:

[0195] -调节pH值;

[0196] -降低电导率;

[0197] -降低温度;

[0198] -增加蛋白质浓度;

[0199] -添加降低水分活性(water activity)的试剂;以及

[0200] -改变离子组成。

[0201] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及将乳清蛋白原料的pH调节至5～6。

[0202] 所有pH值均使用pH玻璃电极测量,并以25℃为标准进行归一化。

[0203] 例如,乳清蛋白溶液的pH可以为4.9～6.1。例如,乳清蛋白溶液的pH可以为5.0～6.1。或者,乳清蛋白溶液的pH可以为5.1～6.1。优选地,乳清蛋白溶液的pH为5.1～6.0。

[0204] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的pH为5.0～6.0。优选地,乳清蛋白溶液的pH为5.1～6.0。更优选地,乳清蛋白溶液的pH为5.1～5.9。甚至更优选地,乳清蛋白溶液的pH可以为5.2～5.9。最优选地,乳清蛋白溶液的pH为5.2～5.8。

[0205] 优选地,使用食品可接受的酸和/或碱调节pH。食品可接受的酸是特别优选的,例如例如羧酸。例如,此类酸的有用实例为盐酸、硫酸、磷酸、乙酸、马来酸、酒石酸、乳酸、柠檬酸或葡萄糖酸和/或它们的混合物。

[0206] 在本发明的一些优选实施方式中,使用内酯(例如D-葡萄糖酸-δ-内酯)来调节pH,其缓慢水解并同时降低了含有它的水性液体的pH。可精确计算内酯水解结束后的目标pH。

[0207] 例如,食物可接受的碱的有用实例为氢氧化物源,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、食用酸的盐(例如柠檬酸三钠)和/或它们的组合。

[0208] 在本发明的其他优选实施方式中,通过添加阳离子交换材料(以其H^+形式)来调节pH。在结晶之前或甚至结晶之后,磁珠型/大颗粒型阳离子交换材料易于从乳清蛋白溶液中除去。通过添加阳离子交换材料(以其H^+形式)来调节pH在本发明中是特别有利的,因为它降低了pH而没有添加显著影响乳清蛋白原料的电导率的负抗衡离子。

[0209] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及降低乳清蛋白原料的电导率。

[0210] 除非另有说明,否则本文所述的电导率值已以25℃为标准进行归一化。

[0211] 发明人已发现,降低乳清蛋白溶液电导率使得BLG晶体产率更高。乳清蛋白溶液的的最低可获得的电导率取决于蛋白级分和脂质级分(如果有)的组成。一些蛋白质种类,例如酪蛋白巨肽(CMP),比其他蛋白质种类对电导率的贡献更大。因此,优选地,使乳清蛋白原料的电导率接近蛋白质和蛋白质的抗衡离子为电导率的主要贡献者的水平。通常,电导率的降低涉及除去至少一些存在于液相中且未与蛋白质紧密结合的小游离离子。

[0212] 通常优选地,乳清蛋白溶液的电导率为至多10mS/cm。在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的电导率为至多5mS/cm。优选地,乳清蛋白溶液的电导率为至多4mS/cm。

[0213] 更低的电导率是甚至更优选的,其能得到更高的BLG晶体产率。因此,优选地,乳清蛋白溶液优选的电导率为至多3mS/cm。在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的电导率为至多1mS/cm。优选地,乳清蛋白溶液的电导率为至多0.5mS/cm。

[0214] 优选地,通过透析或渗滤(diafiltration)来降低乳清蛋白原料的电导率。通过超滤进行渗滤是特别优选的,因为它允许在保留蛋白质的同时洗出盐和小的带电分子。在本发明的一些优选实施方式中,使用相同UF单元来对乳清蛋白原料进行UF/渗滤和随后的浓

缩。

[0215] 本发明人发现,可有利地将电导率(以mS/cm表示)与乳清蛋白溶液中蛋白质总量(以相对于乳清蛋白溶液的总重量,蛋白质总重量%表示)之间的比率保持在某个阈值以下,以促进非聚集BLG的结晶。

[0216] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.3。优选地,乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.25。优选地,乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.20。更优选地,乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.18。甚至更优选地,乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.12。最优选地,乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为至多0.10。

[0217] 例如,优选地,乳清蛋白溶液的电导率与蛋白质总量之间的比率为约0.07或甚至更低。

[0218] 此外,本发明人发现,可有利地对乳清蛋白原料进行调节,以提供UF渗透电导率为至多10mS/cm的乳清蛋白溶液。UF渗透电导率是液体的小分子级分的电导率的量度。当本文中照此使用术语“电导率”时,它指所述液体的电导率。当使用术语“UF渗透电导率”时,它指液体的小分子级分的电导率,其根据实施例1.14进行测量。

[0219] 优选地,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率为至多7mS/cm。更优选地,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率为至多5mS/cm。甚至更优选地,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率可以为至多3mS/cm。

[0220] 甚至可使用更低的UF渗透电导率,如果要获得高产率的非聚集BLG,则更低的UF渗透电导率是甚至特别优选的。因此,优选地,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率为至多1.0mS/cm。更优选地,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率为至多0.4mS/cm。甚至更优选地,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率可以为至多0.1mS/cm。最优选地,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率可以为至多0.04mS/cm。

[0221] 例如,如果渗滤期间使用MilliQ水作为稀释剂(MilliQ水的电导率为约0.06μS/cm),可达到甚至更低的UF渗透电导率。因此,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率可为至多0.01mS/cm。或者,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率可以为至多0.001mS/cm。或者,乳清蛋白溶液的UF渗透电导率可以为至多0.0001mS/cm。

[0222] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及降低乳清蛋白原料的温度。

[0223] 例如,制备乳清蛋白溶液可包括将乳清蛋白原料的温度降低为至少5℃、优选至少10℃、甚至更优选至少15℃。例如,制备乳清蛋白溶液可包括将将乳清蛋白原料的温度降低为至少20℃。

[0224] 例如,乳清蛋白原料的温度可降低为至多30℃、优选至多20℃、甚至更优选至多10℃。本发明人发现,甚至更低的温度提供了更高的过饱和度,因此,乳清蛋白原料的温度例如可降低为至多5℃、优选至多2℃、甚至更优选至多0℃。温度甚至可低于0℃。然而,优选地,乳清蛋白溶液应保持可泵送的,例如以冰浆的形式。

[0225] 在本发明的一些优选实施方式中,在开始BLG结晶之前,乳清蛋白溶液为冰浆。替代地或另外地,在步骤b)的BLG结晶期间,结晶的乳清蛋白溶液可被转化为或保持为冰浆。

[0226] 在本发明的一些特别优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及增加乳清蛋白原料的蛋白质总浓度。例如,可对乳清蛋白原料进行一个以上蛋白质浓缩步骤(例如超滤、纳滤、反渗透和/或蒸发),从而浓缩得到乳清蛋白溶液。

[0227] 超滤是特别优选的,因为它允许选择性地浓缩蛋白质,而盐和碳水化合物的浓度几乎不受影响。如上所述,超滤优选用于乳清蛋白原料的渗滤和浓缩。

[0228] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液中非聚集BLG的浓度低于发生非聚集BLG的自发结晶的水平。因此,通常优选地,当乳清蛋白溶液处于亚稳定区域(即过饱和区域)时,停止对乳清蛋白原料的改变(modification);其中,处于过饱和区域时,当使用晶种时,BLG晶体可生长,但结晶不会自发开始。

[0229] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及向乳清蛋白原料中添加一种以上水分活性降低剂。

[0230] 此类水分活性降低剂的有用但非限制性实例为多糖和/或聚乙二醇(PEG)。

[0231] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及改变乳清蛋白原料的离子组成,例如通过离子交换、添加新的离子种类、透析或渗滤。

[0232] 通常,乳清蛋白溶液通过将两个以上的上述产生过饱和的工艺步骤组合来制备。

[0233] 在本发明的一些优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及至少对乳清蛋白原料进行:

[0234] -浓缩,例如在高于10℃的温度下使用超滤、纳滤或反渗透来浓缩;以及

[0235] -随后冷却至低于10℃的温度。

[0236] 在本发明的其他优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及至少对乳清蛋白原料进行:

[0237] -在高于6.0的pH下浓缩;以及

[0238] -随后通过添加酸(例如H^+形式的GDL或阳离子交换材料)来降低pH。

[0239] 在本发明的其他优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及至少对乳清蛋白原料进行:

[0240] -降低电导率,例如通过使用至少保留非聚集BLG的膜进行渗滤来降低电导率。

[0241] 在本发明的其他优选实施方式中,乳清蛋白溶液的制备涉及至少对乳清蛋白原料进行以下步骤的组合:

[0242] -将pH调至5~6;

[0243] -使用至少保留非聚集BLG的膜进行渗滤来降低电导率;

[0244] -浓缩蛋白质,例如在高于10℃的温度下使用超滤、纳滤或反渗透来浓缩蛋白质;以及

[0245] -最后,冷却至低于10℃的温度。

[0246] 此外,本发明人发现,通过控制钠+钾之和与钙+镁之和之间的摩尔比,可提高本方法的非聚集BLG的产率。出乎意料地,更高的钙和镁的相对含量似乎增加了非聚集BLG的产率,因此提高了本发明方法回收非聚集BLG的效率。

[0247] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤a)的乳清蛋白溶液的Na+K与Ca+Mg之间的摩尔比为至多4。更优选地,步骤a)的乳清蛋白溶液的Na+K与Ca+Mg之间的摩尔比为至多2。甚至更优选地,步骤a)的乳清蛋白溶液的Na+K与Ca+Mg之间的摩尔比为至多1.5,甚至更优

选为至多1.0。最优选地,步骤a)的乳清蛋白溶液的Na+K与Ca+Mg之间的摩尔比为至多0.5,例如至多0.2。

[0248] Na+K与Ca+Mg之间的摩尔比可计算为$(m_{Na}+m_K)/(m_{Ca}+m_{Mg})$,其中,$m_{Na}$为Na的摩尔含量,$m_K$为K的摩尔含量,$m_{Ca}$为元素Ca的摩尔含量,$m_{Mg}$为元素Mg的摩尔含量。

[0249] 特别优选地,乳清蛋白溶液的BLG已通过盐溶过饱和,因此非聚集BLG可以以盐溶模式从乳清蛋白溶液中结晶。

[0250] 在本发明的一些实施方式中,乳清蛋白溶液具有低含量的变性蛋白。这是特别优选的,以避免聚集BLG最终存在于富含ALA的乳清蛋白组合物中。优选地,乳清蛋白溶液的蛋白质变性程度为至多2%、优选至多1.5%、更优选至多1.0%、最优选至多0.8%。

[0251] 该方法的步骤b)涉及使过饱和的乳清蛋白溶液的至少一些非聚集BLG结晶。

[0252] 特别优选地,步骤b)的结晶以盐溶模式进行,即在低离子强度和电导率的液体中进行。这与盐析(salting-out)模式相反,在盐析模式中,大量的盐被加入溶液中以引起结晶。

[0253] 例如,步骤b)的非聚集BLG的结晶可涉及以下步骤中的一项以上:

[0254] -等待结晶发生;

[0255] -添加晶种;

[0256] -进一步提高非聚集BLG的过饱和度;和/或

[0257] -机械刺激。

[0258] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤b)涉及将晶种加入乳清蛋白溶液中。发明人发现,添加晶种使得可以控制BLG结晶发生的时间和地点,以避免处理设备突然堵塞和在生产期间意外停止。例如,通常需要在浓缩乳清蛋白原料时避免开始结晶。

[0259] 特别优选地,在步骤b)的操作期间,乳清蛋白溶液不与UF膜或MF膜接触,除非采用陶瓷膜或高剪切系统(例如DCF)。

[0260] 原则上,可使用任何引发非聚集BLG结晶的晶种材料。然而,优选地,将水合BLG晶体或干燥BLG晶体用于接种,以避免向乳清蛋白溶液中添加其他杂质。

[0261] 当加入乳清蛋白溶液中时,晶种可以为干燥形式或可形成悬浮液的一部分。目前优选地,加入含有晶种(例如BLG晶体)的悬浮液,因为它似乎使得结晶更快开始。优选地,此种悬浮液包含pH为5~6且电导率为至多10mS/cm的晶种。

[0262] 特别优选地,通过在BLG结晶后尚未干燥的BLG晶体的悬浮液来添加晶种。例如,此种悬浮液可以为从先前批次的步骤2)所得BLG晶体和母液的一部分,或从先前批次的步骤3)、步骤4)或步骤5)所得湿BLG晶体的一部分。

[0263] 本发明人已观察到,与使用干燥或水合性差的BLG晶体相比,在步骤2)期间使用湿BLG晶体作为晶种提供了大得多的BLG晶体,这再次使得从母液中分离BLG更为有效。在一项实验中(其中乳清蛋白原料、结晶条件、晶种材料的质量和粒径、冷却曲线和分离方法相同),发明人发现,与用再水化、干燥的BLG晶体接种获得的BLG晶体(所得粒径:40~60μm)相比,使用非干燥BLG晶体接种使所得晶体的粒径(所得粒径:100~130μm)增加了100%。

[0264] 或者,如果晶种基于干燥的BLG晶体,则优选将晶体重悬于水溶液(例如水)中,在将所得的BLG晶体悬浮液用于引发结晶之前,将干燥的BLG晶体再水化至少30分钟、优选至少1.0小时、甚至更优选至少1.5小时。

[0265] 在本发明的一些实施方式中,至少一些晶种位于与乳清蛋白溶液接触的固相上。

[0266] 优选地,与所需的BLG晶体尺寸相比,晶种具有更小的粒径。可通过筛分或其他尺寸分级分离方法除去最大晶种来改变晶种的尺寸。例如,也可在粒径分级之前通过研磨来减小粒径。

[0267] 在本发明的一些实施方式中,至少90%w/w的晶种的粒径(通过筛分分析测量)为0.1~600μm。例如,至少90%w/w的晶种的粒径可以为1~400μm。优选地,至少90%w/w的晶种的粒径可以为5~200μm。更优选地,至少90%w/w的晶种的粒径可以为5~100μm。

[0268] 可调整晶种的粒径和剂量,以提供非聚集BLG的最佳结晶。

[0269] 在本发明的一些优选实施方式中,在实现BLG过饱和之前,将晶种加入乳清蛋白原料中,但优选以此种方式:当达到过饱和时,仍存在至少一些晶种。这可通过(例如冷却、浓缩和/或pH调节期间)当乳清蛋白原料接近过饱和时添加晶种来实现,并且在晶种完全溶解之前达到超饱和状态。

[0270] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤b)涉及进一步增加非聚集BLG的过饱和度,优选增加至立即(即,在至多20分钟、优选至多5分钟内)引发BLG结晶的程度。这也称为成核区,其中,微晶自发形成并开始结晶过程。

[0271] 例如,可通过一个以上的以下步骤来增加过饱和度:

[0272] -进一步增加乳清蛋白溶液的蛋白质浓度;

[0273] -进一步冷却乳清蛋白溶液;

[0274] -使乳清蛋白溶液的pH更接近BLG结晶的最佳pH;

[0275] -进一步降低电导率。

[0276] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤b)包括等待BLG晶体形成。这可能要花费几个小时,通常针对BLG仅略微过饱和且未添加晶种的乳清蛋白溶液。

[0277] 在本发明的一些优选实施方式中,提供乳清蛋白溶液(步骤a)和非聚集BLG的结晶(步骤b)作为两个单独的步骤进行。

[0278] 然而,在本发明的其他优选实施方式中,步骤b)涉及额外调节结晶的乳清蛋白溶液,以提高非聚集BLG的过饱和度,或至少保持过饱和。该额外调节可提高BLG晶体的产率。

[0279] 此种额外调节可能涉及以下中的一项以上:

[0280] -进一步增加结晶的乳清蛋白溶液的蛋白质浓度;

[0281] -将结晶的乳清蛋白溶液冷却至更低的温度;

[0282] -使结晶的乳清蛋白溶液更接近BLG结晶的最佳pH;以及

[0283] -进一步降低结晶的乳清蛋白溶液的电导率。

[0284] 在本发明的一些优选实施方式中,在步骤b)期间使结晶的乳清蛋白溶液保持在亚稳定区中以避免自发形成新的晶体。

[0285] 发明人已通过X射线晶体学确定了分离的BLG晶体的晶格结构,现有技术并未发现类似的晶体。

[0286] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤b)期间所得的至少一些BLG晶体具有正交晶空间群(orthorhombic space group)P 2_1 2_1 2_1。

[0287] 优选地,至少一些所得BLG晶体具有正交晶空间群P 2_1 2_1 2_1;晶胞(unit cell)尺寸a=68.68(±5%)Å、b=68.68(±5%)Å、c=156.65(±5%)Å;晶胞角积分(integral

angle)α=90°、β=90°、γ=90°。

[0288] 在本发明的一些优选实施方式中,至少一些所得BLG晶体具有正交晶空间群P 2_1 2_1 2_1;晶胞尺寸a=68.68(±2%)Å、b=68.68(±2%)Å、c=156.65(±2%)Å;晶胞角积分α=90°、β=90°、γ=90°。

[0289] 甚至更优选地,至少一些所得BLG晶体可具有正交晶空间群P 2_1 2_1 2_1,晶胞尺寸a=68.68(±1%)Å、b=68.68(±1%)Å、c=156.65(±1%)Å;晶胞角积分α=90°、β=90°、γ=90°。

[0290] 最优选地,至少一些所得BLG晶体具有正交晶空间群P 2_1 2_1 2_1;晶胞尺寸a=68.68 Å、b=68.68 Å、c=156.65 Å;晶胞角积分α=90°、β=90°、γ=90°。

[0291] 在本发明的一些特别优选实施方式中,所述方法包括步骤c):从剩余的乳清蛋白溶液中分离出至少一些BLG晶体。当需要纯化非聚集BLG时,这是特别优选的。

[0292] 例如,步骤c)可包括分离BLG晶体至固体含量为至少30%w/w。优选地,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少40%w/w。甚至更优选地,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少50%w/w。

[0293] 发明人已发现,高固体含量有利于非聚集BLG的纯化,因为粘附至分离的BLG晶体的水性部分通常包含应避免的杂质。此外,高固体含量减少了将分离的BLG晶体转化为干燥产物(例如粉末)的能量消耗,并增加了从给定容量的干燥单元获得的非聚集BLG的产率。

[0294] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少60%w/w。优选地,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少70%w/w。甚至更优选地,步骤c)包括分离BLG晶体至固体含量为至少80%w/w。

[0295] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤c)的分离涉及一种以上的以下操作:

[0296] -离心;

[0297] -倾析;

[0298] -过滤;

[0299] -沉降(sedimentation);以及

[0300] -上述操作的组合。

[0301] 这些单元操作对于本领域技术人员而言是众所周知且易于实现的。例如,通过过滤进行分离包括使用真空过滤、动态错流过滤(DCF,dynamic cross-flow filtration)、压滤机或过滤离心机。

[0302] 基于所需结果,可采用不同的孔径进行过滤。优选地,过滤器允许天然乳清蛋白和小聚集体通过但保留BLG晶体。优选地,过滤器的标称孔径为至少0.1μm。例如,过滤器的标称孔径为至少0.5μm。甚至更优选地,过滤器的标称孔径为至少2μm。

[0303] 也可使用孔径较大的过滤器,如果主要应从含有BLG晶体的液体中分离出较大的晶体,则孔径较大的过滤器实际上是优选的。在本发明的一些实施例中,过滤器的标称孔径为至少5μm。优选地,过滤器的标称孔径为至少20μm。甚至更优选地,过滤器的标称孔径为至少40μm。

[0304] 例如,过滤器的孔径为0.03~5000μm(例如0.1~5000μm)。优选地,过滤器的孔径可以为0.5~1000μm。甚至更优选地,过滤器的孔径可以为5~800μm,例如10~500μm或50~

500μm。

[0305] 在本发明的一些优选实施方式中,过滤器的孔径为0.03～100μm。优选地,过滤器的孔径可以为0.1～50μm。更优选地,过滤器的孔径可以为4～40μm。甚至更优选地,过滤器的孔径可以为5～30μm,例如10～20μm。

[0306] 使用孔径大于1μm的过滤器的优点为:在分离期间以及可选的洗涤和/或重结晶期间,至少部分地除去细菌和其他微生物。

[0307] 使用孔径大于1μm的过滤器的另一个优点为:水的除去和随后的干燥变得更容易且能耗更低。

[0308] 在制备乳清蛋白溶液期间,分离出BLG晶体的剩余乳清蛋白溶液可被再循环到乳清蛋白原料中。

[0309] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤c)采用过滤离心机。在本发明的其他优选实施方式中,步骤c)使用沉降式离心机(decanter centrifuge)。初步结果表明,使用过滤离心机和/或沉降式离心机从母液中分离BLG结晶提供了比例如真空过滤更稳健的操作方法。

[0310] 通常优选地,用干燥气体对形成的滤饼进行干燥,以减少滤饼的水分含量,优选使得可从过滤器上剥离滤饼。如果滤饼直接转化成干燥的可食用BLG组合物,则干燥气体的使用可构成分离步骤的一部分,或者可作为最终干燥步骤的一部分。

[0311] 在本发明的一些优选实施方式中,步骤c)采用DCF单元。

[0312] 初始测试(参见实施例6)显示,使用膜孔径为0.03～5μm(优选0.3～1.0μm)的DCF单元可有效分离BLG晶体,发明人已观察到DCF单元运行的可持续时间足以将晶体与甚至大批含有BLG晶体的乳清蛋白溶液分离。

[0313] 在本发明的一些优选实施方式中,使用配有能保留BLG晶体的膜的DCF单元进行步骤c),使DCF渗透物(permeate)再循环以形成乳清蛋白溶液或乳清蛋白原料的一部分,DCF渗余物(retentate)可被回收或放回到结晶槽。优选地,通过例如超滤/渗滤对DCF渗透物进行处理以使BLG过饱和,然后再与乳清蛋白溶液或乳清蛋白原料混合。

[0314] 有利地,这些实施方式不需要将液体流体的温度升至高于15℃,因此与需要更高温度的方法变型相比,不易受到微生物污染。这些实施方式的另一个工业优点是:过饱和度易于控制,可保持在不会发生不需要的自发结晶的水平。因此,在这些方法实施方式期间,液体流体的温度优选为至多15℃,更优选为至多12℃,甚至更优选为至多10℃,最优选为至多5℃。

[0315] 实施例6中举例说明了这些实施方式,并在图6中示出。这些实施方式可以间歇方法或连续方法实施。

[0316] 在本发明的一些优选实施方式中,所述方法包括洗涤BLG晶体的步骤,例如,洗涤步骤c)的分离的BLG晶体。洗涤可包括单个洗涤或多个洗涤步骤。

[0317] 优选地,洗涤包括使BLG晶体与洗涤液接触,而不使BLG晶体完全溶解,然后从洗涤液中分离出剩余的BLG晶体。

[0318] 优选地,选择洗涤液以避免BLG晶体完全溶解,例如,洗涤液可包含或甚至基本上由去离子水、自来水或反渗透的渗透物组成。

[0319] 例如,洗涤液可包含或甚至基本上由冷的脱盐水、冷的自来水或冷的反渗透的渗

透物组成。

[0320] 洗涤液的pH可以为5～6,优选为5.0～6.0,甚至更优选为5.1～6.0,例如5.1～5.9。

[0321] 或者,洗涤液的pH可以为6.1～8,优选为6.4～7.6,甚至更优选为6.6～7.4,例如6.8～7.2。这通常为洗涤液是去离子水、自来水或反渗透的渗透物时的pH。通常优选地,洗涤液的矿物质含量低且缓冲能力低。

[0322] 洗涤液的电导率为至多0.1mS/cm,优选为至多0.02mS/cm,甚至更优选为至多0.005mS/cm。

[0323] 可使用电导率更低的洗涤液。例如,洗涤液的电导率可为至多1μS/cm。或者,洗涤液的电导率可为至多0.1μS/cm,例如约0.05μS/cm。

[0324] 优选地,在低温下进行洗涤步骤以限制结晶的BLG的溶解。洗涤液的温度优选为至多30℃,更优选为至多20℃,甚至更优选为至多10℃。

[0325] 例如,洗涤步骤可在至多5℃(更优选至多2℃,例如约0℃)下进行。可使用低于0℃的温度,只要洗涤液由于例如存在一种以上凝固点抑制剂而在该温度下不冻结即可。

[0326] 在本发明的一些实施方式中,洗涤液包含非聚集BLG,例如,非聚集BLG的量为至少1%w/w(优选至少3%w/w,例如4%w/w)。

[0327] 通常,步骤d)的洗涤溶解BLG晶体初始量的至多80%w/w(优选至多50%w/w、甚至更优选至多20%w/w)。优选地,步骤d)的洗涤溶解BLG晶体初始量的至多15%w/w(优选至多10%w/w、甚至更优选至多5%w/w)。

[0328] 通常,洗涤液的总量与分离的BLG晶体的初始量之间的重量比为至少1,优选为至少2,更优选为至少5。例如,洗涤液的总量与分离的BLG晶体的初始量之间的重量比至少10。或者,洗涤液的总量与分离的BLG晶体的初始量之间的重量比至少20,例如至少50或至少100。

[0329] 术语“洗涤液的总量”指整个期间所用的洗涤液的总量。

[0330] 在本发明的一些优选实施方式中,一个以上洗涤步骤在与BLG晶体分离相同的过滤器布置或相似的过滤器布置中进行。向主要包含BLG晶体的滤饼中添加一个以上步骤的洗涤液,该洗涤液通过过滤器除去,而BLG晶体的剩余部分留在滤饼中。

[0331] 在本发明的特别优选实施方式中,使用保留BLG晶体的过滤器进行步骤c)的分离。随后,滤饼与一个以上量的穿过滤饼和过滤器的洗涤液接触。通常优选地,洗涤液的各个量为滤饼体积的至多10倍,优选为滤饼体积的至多5倍,更优选为滤饼体积的至多1倍,甚至更优选为滤饼体积的至多0.5倍,例如为滤饼体积的至多0.2倍。滤饼的体积包括滤饼的固体和流体(液体和气体)。优选地,以此种方式洗涤滤饼至少2次,优选至少4次,甚至更优选至少6次。

[0332] 例如,可将来自洗涤步骤的用过的洗涤液回收到乳清蛋白原料或乳清蛋白溶液中,从中可将洗出的非聚集BLG再次分离出来。

[0333] 此外,该方法可包括涉及重结晶步骤的步骤,该步骤包括:

[0334] -将分离出的BLG晶体溶解在重结晶液体中;

[0335] -调节重结晶液体,使得BLG过饱和;

[0336] -在过饱和、经调节的重结晶液体中结晶非聚集的BLG;以及

[0337] -从剩余的经调节的重结晶液体中分离BLG晶体。

[0338] 重结晶可包含单个重结晶步骤或多个重结晶步骤。

[0339] 在本发明的一些实施方式中,将步骤c)的BLG晶体或随后洗涤的BLG晶体重结晶至少2次。例如,BLG晶体可重结晶至少3次,例如至少4次。

[0340] 洗涤和重结晶步骤可以任何顺序组合,如果需要可进行多次。

[0341] 例如,可对步骤c)的分离的BLG晶体进行工艺步骤:

[0342] -一个以上洗涤步骤;然后

[0343] -一个以上重结晶步骤。

[0344] 或者,可对步骤c)的分离的BLG晶体进行工艺步骤:

[0345] -一个以上重结晶步骤;然后

[0346] -一个以上洗涤步骤。

[0347] 也可将多个洗涤步骤和重结晶步骤组合,例如按以下顺序:

[0348] -一个以上洗涤步骤;

[0349] -一个以上重结晶步骤;

[0350] -一个以上洗涤步骤;以及

[0351] -一个以上重结晶步骤。

[0352] 或者,例如按以下顺序:

[0353] -一个以上重结晶步骤;

[0354] -一个以上洗涤步骤;

[0355] -一个以上重结晶步骤;以及

[0356] -一个以上洗涤步骤。

[0357] 步骤d)提供了源自回收的母液的第一组合物。

[0358] 在本发明的上下文中,术语“源自回收的母液的第一组合物”和“第一组合物”涉及水性液体组合物,其至少包含回收的母液中的大量的ALA,优选包含回收的母液中基本上所有的ALA。

[0359] 在本发明的一些实施方式中,第一组合物包含回收的母液中的至少20%(优选至少40%、更优选至少60%、甚至更优选至少80%、最优选至少90%)的ALA。优选地,第一组合物包含回收的母液中的基本上所有的ALA。

[0360] 在本发明的其他优选实施方式中,第一组合物包含或甚至由回收的母液组成。因此,可能优选地,第一组合物为回收的母液本身。

[0361] 在本发明的其他优选实施方式中,第一组合物是回收的母液的蛋白质浓缩物。

[0362] 在本发明的一些实施方式中,还可能第一组合物包含一种以上其他乳清蛋白源;通常优选地,相对于蛋白质总量,第一组合物的ALA的重量百分比至少与回收的母液相同。

[0363] 如果回收的母液不具有所需的特性,则提供第一组合物可能例如涉及对回收的母液进行选自以下组的一个以上步骤:

[0364] -脱盐;

[0365] -添加矿物质;

[0366] -稀释;

[0367] -浓缩;

[0368] -物理减少微生物;以及

[0369] -pH调节。

[0370] 脱盐的非限制性实例包括例如透析、凝胶过滤、UF/渗滤、NF/渗滤和离子交换色谱。

[0371] 添加矿物质的非限制性实例包括添加可溶性、可食用的盐,例如Na、K、Ca和/或Mg的盐。例如,此类盐可以为磷酸盐、氯盐或食用酸的盐,例如柠檬酸盐、乳糖醛酸盐或乳酸盐。矿物质可以以固体、悬浮液或溶解形式添加。

[0372] 稀释的非限制性实例包括例如添加液体稀释剂,例如水、脱盐水或矿物质、酸或碱的水溶液。

[0373] 浓缩的非限制性实例包括例如蒸发、反渗透、纳滤、超滤及它们的组合。

[0374] 如果浓缩必须增加蛋白质相对于总固体的浓度,则优选使用浓缩步骤如超滤或透析。如果浓缩不必增加蛋白质相对于总固体的浓度,则可采用例如蒸发、纳滤和/或反渗透的方法。

[0375] 物理减少微生物的非限制性实例包括例如热处理、细菌过滤、紫外线辐射、高压处理、脉冲光处理、脉冲电场处理和超声。这些方法是本领域技术人员众所周知的。

[0376] 通常,细菌过滤涉及微滤或大孔超滤,需要能够保留微生物但允许蛋白质和其他目标组分通过的孔径。有用的孔径通常为至多1.5μm,优选为至多1.0μm,更优选为至多0.8μm,甚至更优选为至多0.5μm,最优选为至多0.2μm。细菌过滤的孔径通常为至少0.1μm。

[0377] 例如,细菌过滤可涉及孔径为0.02～1μm、优选0.03～0.8μm、更优选0.04～0.6μm、甚至更优选0.05～0.4μm、最优选0.1～0.2μm的膜。

[0378] 在本发明的一些优选实施方式中,对待处理液体(优选母液)进行细菌过滤,然后使用至多80℃(优选至多75℃)的温度进行热处理。优选地,选择该热处理的温度和持续时间的组合以提供无菌液体。

[0379] 在本发明的其他优选实施方式中,对待处理液体(优选母液)进行细菌过滤,然后使用至少150℃的温度进行至多0.2秒(优选至多0.1秒)的持续时间的热处理。优选地,选择该热处理的温度和持续时间的组合以提供无菌液体。

[0380] 在本发明的一些优选实施方式中,物理减少微生物包括或甚至由热处理组成。

[0381] 优选地,热处理至少包括巴氏灭菌。

[0382] 在特别优选的实施方式中,热处理涉及加热至70～80℃的温度。

[0383] 在本发明的一些优选实施方式中,热处理的温度为70～80℃,优选为70～79℃,更优选为71～78℃,甚至更优选为72～77℃,最优选为73～76℃,例如约75℃。

[0384] 优选地,当在70～80的温度下进行热处理时,热处理的持续时间为1秒至30分钟。最高的暴露时间最适合最低的温度范围,反之亦然。

[0385] 在本发明的特别优选实施方式中,热处理提供70～78℃的温度1秒至30分钟,更优选71～77℃的温度1分钟至25分钟,甚至更优选72～76℃的温度2分钟到20分钟。

[0386] 在一些实施方式中,更高的温度也可能是优选的,特别是如果需要在干燥之前使非聚集BLG展开且可选地聚集。例如,热处理的温度可以为至少81℃,优选为至少91℃,更优选为至少100℃,甚至更优选为至少120℃,最优选为至少140℃。

[0387] 例如,热处理可能涉及90～130℃的温度和4秒～30分钟的持续时间。例如,热处理

可能涉及加热至90～95℃的温度持续1～10分钟,例如加热至约120℃持续约20秒。或者,热处理可能涉及加热至115～125℃的温度持续5～30秒,例如加热至约120℃持续约20秒。

[0388] 可选地,例如,热处理可以为UHT型处理,其通常涉及135～144℃的温度和2～10秒的持续时间。

[0389] 或者,但也优选地,热处理可能涉及145～180℃的温度和0.01～2秒的持续时间,更优选地150～180℃的温度和0.01～0.3秒的持续时间。

[0390] 进行热处理可涉及使用常规设备,例如板式或管式热交换器、刮擦式表面热交换器或干馏系统。或者,对于95℃以上的热处理,特别优选地,可采用直接的基于蒸汽的加热,例如使用直接蒸汽注射、直接蒸汽输注或喷雾蒸煮(spray cooking)。此外,此种直接的基于蒸汽的加热优选与快速冷却结合使用。实施喷雾蒸煮的合适实例可见于WO2009113858A1,其内容通过引用并入本文以用于所有目的。进行直接蒸汽注射和直接蒸汽输注的合适实施例可见于WO2009113858A1和WO 2010/085957A3,其内容通过引用并入本文以用于所有目的。例如,高温处理的一般方面可见于《食品加工中的热技术》(Thermal technologies in food processing)ISBN 185573558 X,其内容通过引用并入本文以用于所有目的。

[0391] pH调节的非限制性实例包括例如加入碱和/或酸(优选食品可接受的碱和/或酸)。特别优选地,使用能够螯合二价金属阳离子的酸和/或碱。此类酸碱的实例为:EDTA、柠檬酸、柠檬酸盐、乳糖酸、乳糖酸盐、葡萄糖酸、葡萄糖酸盐、乳酸、乳酸盐、磷酸、磷酸盐及它们的组合。

[0392] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物的pH具有与母液基本上相同的pH,因此优选pH为5～6。或者,第一组合物的pH可以为5～6之外的pH范围。

[0393] 发明人进行的初步实验已显示,例如,回收的母液如果被浓缩或冷却至更低的温度,则其通常能够进行连续的BLG结晶。本发明人认为,回收的母液仍含有小晶体碎片,该小晶体碎片没有经过步骤c)的分离,因此已被接种晶种以进行结晶。为了减少干燥所需的能量,通常在干燥之前浓缩液体,但如果如此使用回收的母液,则该浓缩会促使形成不需要的BLG晶体。发明人已发现,为避免生产中的不需要的结晶和结垢,在干燥产物之前或浓缩产物之前,使回收的母液的非聚集BLG水平低于过饱和水平是有益的。

[0394] 因此,在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物或第一组合物的蛋白质浓缩物中的BLG不饱和。或者,第一组合物或第一组合物的蛋白质浓缩物中的BLG可以是过饱和的,只要它不包含BLG晶体即可。

[0395] 步骤e)的pH调节确保了第一组合物或第一组合物的蛋白质浓缩物不是过饱和的。如果第一组合物或其蛋白质浓缩物的pH为5.0～6.0,则优选对非聚集BLG浓度、电导率和/或温度进行选择,以避免过饱和。

[0396] 在本发明的其他优选实施方式中,第一组合物是回收的母液的ALA分离物。如果这样,提供第一组合物包括对回收的母液进行进一步的ALA富集。

[0397] 在本发明的上下文中,术语“进一步的ALA富集”指提供第一组合物涉及一个以上工艺步骤,即进一步的ALA富集,其提供了第一组合物,与回收的母液相比,所述第一组合物中ALA相对于蛋白质总量的重量百分比至少高5%。

[0398] 因此,例如,与回收的母液相比,第一组合物中ALA相对于蛋白质总量的重量百分

至少高5％。优选地,与回收的母液相比,第一组合物中ALA相对于蛋白质总量的重量百分至少高10％,更优选至少高20％,甚至更优选至少高30％,最优选至少高50％。

[0399] 可能需要甚至更高水平的ALA富集;在本发明的一些优选实施方式中,与回收的母液相比,第一组合物中ALA相对于蛋白质总量的重量百分至少高75％。优选地,与回收的母液相比,第一组合物中ALA相对于蛋白质总量的重量百分至少高100％,更优选至少高150％,甚至更优选至少高200％,最优选至少高400％。

[0400] 第一组合物中ALA的重量百分比取决于母液如何被加工以获得第一组合物,但相对于蛋白质总量通常为至少20％w/w。优选地,第一组合物中的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少25％w/w。更优选地,第一组合物中的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少30％w/w。甚至更优选地,第一组合物中的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少40％w/w。最优选地,第一组合物中的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少50％w/w。

[0401] 本发明人预计,如果乳清蛋白原料为不含CMP的乳清蛋白源(例如从酸性乳清或奶清蛋白中分离出的乳清蛋白分离物)且如实施例5所述地使用DCF,则可获得相对于蛋白质总量大于60％的ALA重量百分比。

[0402] 因此,在本发明的一些优选实施方式中,第一组合中的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少60％w/w。更优选地,第一组合物的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少70％w/w。甚至更优选地,第一组合物的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少80％w/w。最优选地,第一组合物的ALA相对于蛋白质总量的重量百分比为至少90％w/w。

[0403] 可通过任何合适的方法来进行ALA的进一步富集。

[0404] 在本发明的一些优选实施方式中,ALA的进一步富集涉及A型富集,其涉及将pH调节至3.5～5.5并加热至50-70℃以形成ALA的可逆聚集,随后回收聚集的ALA。然后,通过该工艺回收的ALA将形成第一组分的一部分。进一步富集ALA的此类方法的有用实例描述于美国专利5,455,331(Pearce等)、美国专利6,613,377和Muller等(Lait 83,第439～451页,2003年),其内容通过引用并入本文以用于所有目的。

[0405] 在本发明的一些优选实施方式中,ALA的进一步富集涉及B型富集,其涉及使回收的母液进行离子交换色谱法。进一步富集ALA的此类方法的有用实例描述于de Jongh等(Mild Isolation Procedure Discloses New Protein Structural Properties ofβ-Lactoglobulin,J Dairy Sci.2001,84(3):562～571)和Vyas等(Scale-Up of Nativeβ-Lactoglobulin Affinity Separation Process,J.Dairy Sci.2002,85:1639-1645),其内容通过引用并入本文以用于所有目的。

[0406] 在本发明的一些优选实施方式中,ALA的进一步富集涉及使用膜分离将ALA与其他乳清蛋白分离的C型富集。US 5,008,376中描述了用于进一步富集ALA的此种方法的有用实例,其内容通过引用并入本文以用于所有目的。

[0407] 在本发明的一些优选实施方式中,ALA的进一步富集涉及在至多pH 4的pH下使用超滤从ALA和其他乳清蛋白中除去CMP的D型富集。酸性超滤步骤的有用实施方式和实例描述于WO2014076252A1、WO9929183A1和US5278288中,其内容通过引用并入本文以用于所有目的。

[0408] 例如,ALA的进一步富集可涉及选自A型、B型、C型和D型中的两种以上富集工艺的

组合。

[0409] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物包含的ALA相对于蛋白质总量为至少92%w/w,优选为至少95%w/w,更优选为至少97%w/w,甚至更优选为至少98%,最优选非聚集BLG相对于蛋白质总量为至少99.5%w/w。

[0410] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物包含的蛋白质总量为至少5%w/w,优选为至少10%w/w,更优选为至少15%w/w,甚至更优选为至少20%,最优选为至少30%w/w。

[0411] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物包含的蛋白质总量为5~40%w/w,优选为10~35%w/w,更优选为15~30%w/w,甚至更优选为20~25%w/w。

[0412] 本发明人已观察到,第一组合物中增加的蛋白质浓度得到体密度(bulk density)更高的喷雾干燥粉末,因此优选在第一组合物中具有相对较高的蛋白质浓度。

[0413] 因此,在本发明的其他优选实施方式中,第一组合物包含的蛋白质总量为10~40%w/w,优选为20~38%w/w,更优选为24~36%w/w,甚至更优选地为28~34%w/w。

[0414] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物包含的固体总量为5~50%w/w,优选为10~40%w/w,更优选为15~35%w/w,甚至更优选为20~30%w/w。

[0415] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物包含的水含量为50~95%w/w,优选为60~90%w/w,更优选为65~85%w/w,甚至更优选为70~80%w/w。

[0416] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物包含的碳水化合物的量为至多60%w/w,优选为至多50%w/w,更优选为至多20%w/w,甚至更优选为至多10%w/w,甚至更优选为至多1%w/w,最优选为至多0.1%w/w。例如,第一组合物可包含碳水化合物,例如乳糖、寡糖和/或乳糖的水解产物(即葡萄糖和半乳糖)、蔗糖和/或麦芽糊精。

[0417] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物包含的脂质的量为至多10%w/w,优选为至多5%w/w,更优选为至多2%w/w,甚至更优选为至多0.1%w/w。

[0418] 本发明人发现控制矿物含量以达到第一组合物的某些所需性能可能是有益的。

[0419] 在本发明的一些优选实施方式中,第一组合物的Na、K、Mg和Ca的总量为至多10mmol/g蛋白质。优选地,第一组合物的Na、K、Mg和Ca的总量为至多6mmol/g蛋白质,更优选为至多4mmol/g蛋白质,甚至更优选为至多2mmol/g蛋白。

[0420] 在本发明的其他优选实施方式中,第一组合物的Na、K、Mg和Ca的总量为至多1.0mmol/g蛋白质。优选地,第一组合物的Na、K、Mg和Ca的总量为至多0.6mmol/g蛋白质,更优选为至多0.4mmol/g蛋白质,甚至更优选为至多0.2mmol/g蛋白。最优选为至多0.1mmol/g蛋白质。

[0421] 在本发明的其他优选实施方式中,第一组合物的Mg和Ca的总量为至多5mmol/g蛋白质。优选地,第一组合物的Mg和Ca的总量为至多3mmol/g蛋白质,更优选为至多1.0mmol/g蛋白质,甚至更优选为至多0.5mmol/g蛋白。

[0422] 在本发明的其他优选实施方式中,第一组合物的Mg和Ca的总量为至多0.3mmol/g蛋白质。优选地,第一组合物的Mg和Ca的总量为至多0.2mmol/g蛋白质,更优选为至多0.1mmol/g蛋白质,甚至更优选为至多0.03mmol/g蛋白质,最优选为至多0.01mmol/g蛋白质。

[0423] 对于某些应用,需要改变第一组合物的pH以获得具有适当特性的产品。在此类实

施方式中,本发明的方法包括步骤e)。

[0424] 因此,在本发明的一些优选实施方式中,所述方法包括步骤e),其中:

[0425] -将第一组合物的pH调节至2.5~4.9、优选2.8~4.5、更优选2.8~3.2,或

[0426] -将第一组合物的pH调节至6.1~8.5、优选6.3~8.0、甚至更优选6.5~7.5。

[0427] 例如,可将第一组合物的pH调节至2.5~4.9、优选2.8~4.5、更优选2.8~3.2。

[0428] 或者,可将第一组合物的pH调节至6.1~8.5、优选6.3~8.0、更优选6.5~7.5。

[0429] 优选地,pH调节用本文所述的一种以上食品级酸和碱进行,如果使用强酸或碱,则优选用稀酸或稀碱进行。

[0430] 步骤f)涉及干燥:

[0431] -由步骤d)获得的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;或者

[0432] -由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物或它的蛋白质浓缩物。

[0433] 步骤f)的干燥通常包括喷雾干燥或冷冻干燥。

[0434] 在本发明的一些优选实施方式中,进行干燥的液体流体是pH经调节的第一组合物的蛋白质浓缩物。

[0435] 术语"进行干燥的液体流体"属于以下液体之一:

[0436] -由步骤d)获得的第一组合物;

[0437] -由步骤d)获得的第一组合物的蛋白质浓缩物;

[0438] -由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物;或

[0439] -由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物的蛋白质浓缩物。

[0440] 在本发明的其他优选实施方式中,进行干燥的液体流体是第一组合物的蛋白质浓缩物。

[0441] 喷雾干燥是目前优选的干燥方法。

[0442] 在本发明的一些实施方式中,当到达喷雾装置(例如喷嘴或雾化器)的出口时,进行干燥的液体流体的温度为至多70℃,优选为至多60℃,更优选为至多50℃。在本发明的一些优选实施方式中,当到达喷雾装置的出口时,进行干燥的液体流体的温度为至多40℃,优选为至多30℃,更优选为至多20℃,甚至更优选为至多10℃,最优选为至多5℃。

[0443] 喷雾干燥器的喷雾装置例如是喷嘴或雾化器,其将待干燥的溶液或悬浮液转化为液滴,这些液滴进入喷雾干燥器的干燥室。

[0444] 特别优选地,当到达喷雾装置的出口时,进行干燥的液体流体的温度为0~50℃,优选为2~40℃,更优选为4-35℃,最优选为5~10℃。

[0445] 喷雾干燥器的气体的入口温度优选为140~220℃,更优选为160~200℃,甚至更优选为170~190℃,例如优选为约180℃。喷雾干燥器的气体的出口温度优选为50-95℃,更优选为70~90℃,甚至更优选为80~88℃,例如优选为约85℃。根据经验,认为进行喷雾干燥的固体被加热至比气体出口温度低10~15℃的温度。

[0446] 在本发明的一些优选实施方式中,喷雾干燥器优选为50~85℃,更优选为60~80℃,甚至更优选为65~75℃,例如优选为约70℃。

[0447] 此外,干燥步骤可包括流化床干燥,例如集成在喷雾干燥设备中,或作为独立单元在喷雾干燥后进行。

[0448] 喷雾干燥和流化床干燥的组合使得可以减少待干燥的液滴在喷雾干燥室移动时

被除去的水量,而通过流化床干燥从湿润粉末中除去残留的水。与仅通过喷雾干燥进行干燥相比,该方案用于干燥需要的能量更少,并且还使得可以通过例如速化复水(instantization)和/或团聚(agglomeration)来改性粉末。优选地,通过将卵磷脂或另一种有用的润湿剂施加到粉末表面上来进行速化复水。当进行速化复水时,相对于最终粉末的总重量,溶解在可食用油中的速化复水试剂(例如卵磷脂)的添加量通常为0.5-2%w/w,优选为1.0~1.5%w/w。

[0449] 本发明人已注意到,结晶过程(包括制备乳清蛋白溶液)易于生长微生物,发现改进该过程以解决该问题是有益的。

[0450] 特别优选地,从提供乳清蛋白原料到步骤f)的干燥或随后将ALA用于食品生产,ALA分子处于高于12℃的温度的总时间为至多24小时、优选20小时、更优选至多12小时、甚至更优选至多6小时、最优选至多3小时。

[0451] 可能且通常优选地,进一步减少持续时间;因此,在本发明的某些优选实施方式中,从提供乳清蛋白原料到步骤f)的干燥或随后将ALA用于食品生产,ALA分子处于高于12℃的温度的总时间为至多2小时、优选1小时、更优选至多0.5小时、甚至更优选至多0.3小时、最优选至多0.1小时。

[0452] 此外,优选地,所述方法包括至少一种物理减少微生物,其优选在除去BLG晶体之后应用于母液,和/或在步骤c)之后应用于包含ALA的液体流体。

[0453] 优选地,物理减少微生物包括以下步骤中的一项以上:

[0454] -热处理,优选至少巴氏灭菌;

[0455] -紫外线辐射处理;

[0456] -脉冲光处理;

[0457] -脉冲电场处理;

[0458] -微滤;

[0459] -高压处理;以及

[0460] -超声处理。

[0461] 这些过程是本领域技术人员众所周知的,本文已提供了有关热处理的更多细节。

[0462] 涉及微滤的物理减少微生物需要能够保留微生物但允许蛋白质和其他目标成分通过的孔径。有用的孔径通常为至多1.5μm,优选为至多1.0μm,更优选为至多0.8μm,甚至更优选为至多0.5μm,最优选为至多0.2μm。细菌过滤的孔径通常为至少0.1μm。

[0463] 优选地,进行干燥的液体流体具有低含量的微生物。在本发明的一些实施方式中,进行干燥的液体流体包含至多500.000CFU/g、优选至多100.000CFU/g、更优选至多50.000CFU/g、甚至更优选至多10.000CFU/g。

[0464] 优选地,进行干燥的液体流体可包含至多1000个菌落形成单位(CFU,colony-forming unit)/g。甚至更优选地,进行干燥的液体流体包含至多600CFU/g。更优选地,进行干燥的液体流体包含至多300CFU/g。甚至更优选地,进行干燥的液体流体包含至多100CFU/g。甚至更优选地,进行干燥的液体流体包含至多50CFU/g。最优选地,进行干燥的液体流体包含至多20CFU/g,例如,至多10CFU/g。在一个特别优选实施方式中,进行干燥的液体流体是无菌的。例如,可以通过在干燥液体流体期间结合几种物理减少微生物工艺来制备进行干燥的液体流体。

[0465] 该方法通常包括包装可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物的步骤。通常,食用乳清蛋白组合物包装在合适的容器中,随后将其封闭和/或密封。例如,包装可在无菌或无菌条件下进行,例如将可食用乳清蛋白组合物填充并密封到无菌容器中。

[0466] 本发明的另一方面涉及可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物,例如可通过本文所述的方法获得。

[0467] 在本发明的一些优选实施方式中,可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物包含:

[0468] -相对于蛋白质总量,含量为24～80%w/w、优选为24～70%w/w的ALA;

[0469] -相对于蛋白质总量,含量为3～14%w/w的免疫球蛋白;以及

[0470] -可选地,相对于蛋白质总量,含量为1～6%w/w、优选为2～5%w/w的磷脂。

[0471] 根据Vaghela等(Vaghela等,Quantitative analysis of phospholipids from whey protein concentrates by high-performance liquid chromatography with a narrow-bore column and an evaporative light-scattering detector,American Oil Chemists'Society 1995,72(6):729-733)来测量磷脂的含量。

[0472] 例如,当乳清蛋白原料是未经蛋白变性热处理的血清蛋白浓缩物时,可获得此类可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物。

[0473] 发明人发现,能够提供除ALA之外还包含免疫球蛋白且还可选地包含磷脂的可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物是特别有利的,因为这些组分可用于儿科营养。

[0474] 在本发明的一些实施方式中,相对于蛋白质总量,可食用的富含ALA的乳清蛋白组合物包含至多15%w/w的酪蛋白类。

[0475] 在本发明的一些优选实施方式中,富含ALA的乳清蛋白组合物可包含:

[0476] -相对于蛋白质总量,40～70%w/w的ALA;

[0477] -相对于蛋白质总量,至多15%w/w的酪蛋白类;以及

[0478] -相对于蛋白质总量,至少3%w/w的免疫球蛋白。

[0479] 本发明的一个优点是:所获得的富含ALA的乳清蛋白组合物通常经过非常温和的处理,没有受到过度的热应激。在本发明的一些优选实施方式中,富含ALA的乳清蛋白组合物的糠氨酸值为至多50mg/100g蛋白质。优选地,富含ALA的乳清蛋白组合物的糠氨酸值为至多30mg/100g蛋白质。更优选地,富含ALA的乳清蛋白组合物的糠氨酸值为至多20mg/100g蛋白质。甚至更优选地,富含ALA的乳清蛋白组合物的糠氨酸值为至多10mg/100g蛋白质。最优选地,富含ALA的乳清蛋白组合物的糠氨酸值为至多2mg/100g蛋白质,优选根本没有可检测到的糠氨酸值。

[0480] 通常,富含ALA的乳清蛋白组合物中的BLG的含量相对较低。在本发明的一些优选实施方式中,相对于蛋白质总量,富含ALA的乳清蛋白组合物包含至多40%w/w的BLG。优选地,相对于蛋白质总量,富含ALA的乳清蛋白组合物包含至多30%w/w的BLG。更优选地,相对于蛋白质总量,富含ALA的乳清蛋白组合物包含至多20%w/w的BLG。甚至更优选地,相对于蛋白质总量,富含ALA的乳清蛋白组合物包含至多10%w/w的BLG。最优选地,相对于蛋白质总量,富含ALA的乳清蛋白组合物包含至多2%w/w的BLG。例如,优选地,相对于蛋白质总量,富含ALA的乳清蛋白组合物包含至多0.5%w/w的BLG。

[0481] 本发明的另一方面涉及一种生产食物产品的方法,所述方法包括以下步骤:

[0482] a)提供乳清蛋白溶液,所述乳清蛋白溶液包含非聚集BLG、ALA和可选的其他乳清

蛋白,所述乳清蛋白溶液是BLG过饱和的且pH为5～6;

[0483] b)在过饱和的乳清蛋白溶液中结晶非聚集的BLG,优选以盐溶模式结晶;以及

[0484] c)从剩余的母液中分离BLG晶体,回收至少一些母液;

[0485] d)提供第一组合物,所述第一组合物来自回收的母液和可选的用过的洗涤液;

[0486] e)可选地,将所述第一组合物的pH调节至:

[0487] i)pH为2.5～4.9;或者

[0488] ii)pH为6.1～8.5;

[0489] f)可选地,干燥由步骤d)获得的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;或者干燥由步骤e)获得的经pH经调节的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;

[0490] g)将如下组分与一种以上成分混合,并将获得的混合物转换为食物产品:

[0491] g1)由步骤d)获得的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;

[0492] g2)由步骤e)获得的pH经调节的第一组合物或它的蛋白质浓缩物;和/或

[0493] g3)由步骤f)获得的干燥的组合物。

[0494] 该食物产品是婴儿配方食品、饮料、速溶饮料粉、蛋白质棒、粥或冰沙。

[0495] 用于制备食物产品的一种以上成分通常包含一种以上非乳碳水化合物、非乳脂质和/或非乳蛋白质。术语“非乳碳水化合物”指牛乳中不存在的碳水化合物。术语“非乳脂质”指牛乳中不存在的脂质。术语“非乳碳水化合物”指牛乳中不存在的蛋白质。

[0496] 富含ALA的乳清蛋白组合物的氨基酸特征特别适合婴儿配方食品和其他儿科食物产品。

[0497] 本发明的又一个方面涉及食物产品(优选营养产品),其包含富含ALA的乳清蛋白组合物,例如可通过上述方法获得。

[0498] 本发明的另一方面涉及一种营养产品,其包含如本文所述的富含ALA的乳清蛋白组合物。

[0499] 在本发明的上下文中,术语“营养产品”涉及可食用产品(即人类可安全食用的产品),其至少包含蛋白质和以下中的一种以上:脂质、碳水化合物、矿物质和维生素。营养产品优选包含蛋白质、碳水化合物和脂质,甚至更优选包含蛋白质、碳水化合物、脂质、矿物质和维生素。

[0500] 在本发明的一些优选实施方式中,营养产品是适用于临床营养的营养产品、适用于运动营养的营养产品或适用于儿科营养的营养产品。

[0501] 特别优选地,营养产品为小儿营养产品。优选地,营养产品为营养完全的婴儿配方食品或婴儿配方食品基质,其至少包含婴儿配方食品所需的蛋白质。或者,但也优选地,小儿营养产品可以为后续配方食品或成长乳。

[0502] 在本发明的一些优选实施方式中,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含:

[0503] -相对于蛋白质总量,至少40％w/w、优选至少45％w/w的ALA;以及

[0504] -相对于蛋白质总量,至少5％w/w的免疫球蛋白。

[0505] 在本发明的其他实施方式中,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含:

[0506] -相对于蛋白质总量,40～70％w/w的ALA;

[0507] -相对于蛋白质总量,至多15％w/w的酪蛋白类;以及

[0508] -至少5％w/w的免疫球蛋白。

[0509] 在本发明的一些优选实施方式中,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含:

[0510] -相对于蛋白质总量,含量为24～80%w/w、优选40～70%w/w、更优选45～65%w/w的ALA;

[0511] -相对于蛋白质总量,含量为5～14%w/w的免疫球蛋白;

[0512] -可选地,相对于蛋白质总量,含量为1～6%w/w、优选2～5%w/w的磷脂。

[0513] 在本发明的一些实施方式中,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含相对于蛋白质总量至多50%w/w的酪蛋白类,优选包含至多40%w/w的酪蛋白类,最优选包含至多30%w/w的酪蛋白类。

[0514] 在本发明的一些优选实施方式中,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含:

[0515] -相对于蛋白质总量,24～50%w/w的ALA;

[0516] -相对于蛋白质总量,20～40%w/w的酪蛋白类;

[0517] -相对于蛋白质总量,至少3～15%w/w的免疫球蛋白。

[0518] 营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)中BLG的含量通常相对较低。在本发明的一些优选实施方式中,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含相对于蛋白质总量至多40%w/w的BLG。优选地,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含相对于蛋白质总量至多30%w/w的BLG。更优选地,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含相对于蛋白质总量至多20%w/w的BLG。甚至更优选地,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含相对于蛋白质总量至多10%w/w的BLG。最优选地,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含相对于蛋白质总量至多2%w/w的BLG。例如,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)包含相对于蛋白质总量至多0.5%w/w的BLG。

[0519] 可包含在营养产品中的一种以上其他成分可有利地选自通常在儿科产品中使用的成分。

[0520] 例如,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)可包含至少一种人乳寡糖(HMO),例如2'-FL和LNnT。研究表明,HMO在改善中枢神经系统(CNS)功能方面具有多种作用。在某些方面,除包含上述2'-FL和LNnT中的至少一种以外,营养产品还包含其他唾液酸化或岩藻糖基化的人乳寡糖(HMO)。

[0521] 营养产品中所用的任何或全部HMO可从哺乳动物分泌的乳中分离或富集,所述哺乳动物包括但不限于:人、牛、绵羊、猪或山羊物种。还可通过微生物发酵、酶促过程、化学合成或它们的组合来生产HMO。

[0522] 例如,包含在婴儿配方食品中的合适的唾液酸化HMO可以例如在寡糖主链中包含至少一个唾液酸残基。在某些方面,唾液酸化的HMO包含两个以上唾液酸残基。

[0523] 替代地或另外地,营养产品还可包含其他类型的寡糖,例如反式-低聚半乳糖(GOS)、低聚果糖(FOS)和/或聚葡萄糖。

[0524] 营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)还可包含一种以上的多不饱和脂肪酸(PUFA),例如二十二碳六烯酸(DHA)、花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、亚油酸、亚麻酸(α亚麻酸)和γ-亚麻酸。

[0525] 研究表明,PUFA在支持婴儿的大脑和视力发育中具有多种作用。申请人认为,在婴儿配方食品中包含DHA和AA可改善神经功能,例如与CNS相关的认知、学习和记忆。

[0526] 在某些方面,PUFA作为游离脂肪酸来提供,以甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯、磷脂

的形式或上述一种以上的混合物(优选以甘油三酯的形式)。PUFA可源自油源,例如植物油、海洋浮游生物、真菌油和鱼油。在某些方面,PUFA源自鱼油,例如鲱鱼油、鲑鱼油、鳀鱼油、鳕鱼油、大比目鱼油、金枪鱼油或鲱鱼油。

[0527] 营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)还可包含一种以上核苷酸,包括例如核苷酸肌苷单磷酸、胞苷5'-单磷酸、尿苷5'-单磷酸、腺苷5'-单磷酸、鸟苷5'-1-单磷酸,更优选胞苷5'-单磷酸、尿苷5'-单磷酸、腺苷5'-单磷酸和鸟苷5'-单磷酸。

[0528] 例如,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)的碳水化合物浓度可以为营养产品重量的约5%至约40%w/w,包括约7%至约30%,包括约10%至约25%。当存在时,按婴儿配方食品的重量计,脂肪浓度最通常为婴儿配方食品重量的约1%至约30%,包括约2%至约15%,还包括约3%至约10%。当存在时,蛋白质浓度最通常为营养产品重量的约0.5%至约30%,包括约1%至约15%,还包括约2%至约10%。

[0529] 在本发明的一些实施方式中,除上述PUFA以外,营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)还包括脂肪来源。适用于本文的脂肪来源包括适合用于口服婴儿配方食品并与该配方食品的基本成分和特征相容的任何脂肪或脂肪来源。

[0530] 用于本文所述的营养产品的合适脂肪或其来源的其他非限制性实例包括椰子油、分级椰子油、大豆油、玉米油、橄榄油、红花油、高油酸红花油、油酸(EMERSOL 6313 OLEIC ACID,Cognis Oleochemicals,马来西亚)、MCT油(中链甘油三酯)、葵花籽油、高油酸葵花籽油、棕榈油和棕榈仁油、棕榈油精、、菜子油、海洋油、鱼油、真菌油、藻类油、棉籽油及它们的组合。

[0531] 除奶清蛋白和酪蛋白以外,营养产品还可包含其他类型的蛋白。用于营养产品(例如以婴儿配方食品的形式)的合适蛋白质或其来源的非限制性实例包括水解、部分水解或非水解的蛋白质或蛋白质来源,这些蛋白质或蛋白质来源可来自任何已知或其他合适的来源,例如动物(例如肉、鱼)、谷物(例如、大米、玉米)、蔬菜(例如大豆)或它们的组合。此类蛋白质的非限制性实例包括高度水解(extensively hydrolyzed)的酪蛋白、大豆分离蛋白和大豆浓缩蛋白。

[0532] 例如,营养产品可包含水解的蛋白质,即蛋白质水解产物。在本文中,术语"水解的蛋白质"或"蛋白质水解产物"可互换使用,包括高度水解的蛋白,其中,水解度最通常为至少约20%,包括约20%至约80%,还包括约30%至约80%,甚至更优选为约40%至约60%。水解度是通过水解方法使肽键断裂的程度。为表征这些实施方式的高度水解的蛋白质组分,通过定量所选液体制剂的蛋白质组分的氨基氮与总氮之比(AN/TN),制剂领域的普通技术人员可容易地确定蛋白质水解度。通过USP滴定法定量测定氨基氮含量来确定氨基氮组分,通过Tecator Kjeldahl法测定总氮组分,所有这些均是分析化学领域的普通技术人员熟知的方法。

[0533] 合适的水解的蛋白质包括大豆蛋白质水解产物、酪蛋白蛋白质水解产物、乳清蛋白质水解产物、大米蛋白质水解产物、马铃薯蛋白质水解产物、鱼蛋白质水解产物、蛋清水解产物、明胶蛋白质水解产物、动物和植物蛋白质水解产物的组合,以及它们的组合。特别优选的蛋白质水解产物包括乳清蛋白质水解产物和水解酪蛋白酸钠。

[0534] 除乳糖以外,营养产品还可包含其他碳水化合物。合适的碳水化合物或其来源的非限制性实例包括:麦芽糊精、水解或改性的淀粉或玉米淀粉、葡萄糖聚合物、玉米糖浆、玉

米糖浆固体、大米来源的碳水化合物、豌豆来源的碳水化合物、马铃薯来源的碳水化合物、木薯淀粉、蔗糖、果糖、乳糖、高果糖玉米糖浆、蜂蜜、糖醇(例如麦芽糖醇、赤藓糖醇、山梨糖醇)、人造甜味剂(例如三氯蔗糖、乙酰磺胺酸钾、甜菊糖)及它们的组合。特别期望的碳水化合物是低葡萄糖当量(DE)的麦芽糊精。

[0535] 通常,将酪蛋白源以足以获得营养产品中酪蛋白与奶清蛋白之间所需重量比的量加入到富含ALA的乳清蛋白组合物中。在本发明的一些优选实施方式中,将富含ALA的乳清蛋白组合物和酪蛋白源混合,使奶清蛋白和酪蛋白之间的重量比为1～9,优选为1～3,甚至优选为1.2～1.9,例如约1.5。

[0536] 在本发明的上下文中,将两种组分A和B之间的重量比确定为组分A的重量除以组分B的重量。因此,如果组合物包含9%w/w的A和6%w/w的B,则重量比为9%/6%＝1.5。

[0537] 本方法的优点是:本方法比现有技术的相当方法结晶非聚集的BLG快得多。从乳清蛋白原料的初始调节到完成步骤c的分离的持续时间可以为至多10小时,优选为至多4小时,更优选为至多2小时,甚至更优选为至多1小时。

[0538] 实施例

[0539] 实施例1-分析方法

[0540] 实施例1.1:测定蛋白质总量

[0541] 样品的蛋白质总量(真蛋白质)如下进行测定:

[0542] 1)按照ISO 8968-1/2|IDF 020-1/2-牛奶(Milk)-氮含量的测定(Determination of nitrogen content)-第1/2部分:使用凯氏定氮法测定氮含量(Determination of nitrogen content using the Kjeldahl method),测定样品的总氮;

[0543] 2)按照ISO 8968-4|IDF 020-4-牛奶(Milk)-氮含量的测定(Determination of nitrogen content)-第4部分:测定非蛋白氮含量(Determination of non-protein-nitrogen content),测定样品的非蛋白氮;以及

[0544] 3)计算蛋白质总量为$(m_{总氮}-m_{非蛋白氮})*6.38$。

[0545] 实施例1.2:测定非聚集BLG、ALA和CMP

[0546] 通过HPLC分析以0.4mL/min分别分析非聚集的α-乳白蛋白(ALA)、β-乳球蛋白(BLG)和酪蛋白巨肽(CMP)的含量。将25μL过滤后的样品注入2个TSKgel3000PWxl(7.8mm 30cm,日本Tosohass)色谱柱,该色谱柱与用洗脱液(由465g Milli-Q水、417.3g乙腈和1mL三氟乙酸组成)平衡的附接预装柱PWxl(6mm×4cm,日本Tosohass)串联,使用210nm的UV检测器。

[0547] 通过将相应标准蛋白的峰面积与样品的峰面积进行比较,对天然α-乳白蛋白(C_{α})、β-乳球蛋白(C_{β})和酪蛋白巨肽(C_{CMP})的含量进行定量测定。

[0548] 通过从(根据实施例1.1测定的)蛋白质总量中减去BLG的量来确定其他蛋白质(非BLG蛋白质)的总量。

[0549] 实施例1.3:测定浊度

[0550] 浊度是由大量肉眼通常看不见的颗粒引起的流体浑浊或混浊,类似于空气中的烟雾。

[0551] 浊度以散射浊度单位(NTU)测量。

[0552] 将20mL饮料/样品加入NTU玻璃杯中,放入Turbiquant®3000 IR浊度仪中。稳定后测

量NTU值,重复两次。

[0553] 实施例1.4:测定粘度

[0554] 使用流变仪(Anton Paar,Physica MCR301)测量饮料制剂的粘度。

[0555] 将3.8mL样品加入杯DG26.7中。将样品平衡至22℃,然后以50s^{-1}预剪切30秒,然后进行30秒平衡时间、以1s^{-1}至200s^{-1}至1s^{-1}的剪切速率进行扫描。

[0556] 除非另有说明,否则粘度以100s^{-1}的剪切速率下的厘泊(cP)表示。测得的cP值越高,粘度越低。

[0557] 或者,使用吉尔森(Gilson)的Viscoman估算粘度,剪切速率为约300s^{-1}。

[0558] 实施例1.5:测定灰分含量

[0559] 食物产品的灰分含量根据NMKL 173:2005“重量测定食品中的灰分(Ash,gravimetric determination in foods)”测得。

[0560] 实施例1.6:测定电导率

[0561] 水溶液的“电导率”(有时称为“比电导”)是溶液导电能力的量度。例如,电导率可通过测量两个电极之间溶液的交流电阻来测定,其结果通常以单位毫西门子/厘米(mS/cm)表示。例如,电导率可根据EPA(美国环境保护局)第120.1号方法来测量。

[0562] 除非另有说明,否则本文提到的电导率值以25℃为标准进行归一化。

[0563] 电导率用电导率仪(带四极325电极的WTW Cond 3210)测得。

[0564] 使用前,已按照手册中的说明对系统进行了校准。为避免局部稀释,在与进行测量相同的介质中彻底冲洗电极。将电极下降到介质中,以使待测量区域完全浸没。然后搅动电极,以除去任何残留在电极上的空气。然后将电极保持静止,直至可获取稳定值并从显示器记录下来。

[0565] 实施例1.7:测定溶液的固体总量

[0566] 溶液的固体总量可根据NMKL 110第二版,2005(固体总量(水)-牛奶和奶制品中的重量测定,Total solids(Water)-Gravimetric determination in milk and milk products)进行测定。NMKL是“Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler”的缩写。

[0567] 溶液的水含量可计算为100%减去固体总量的相对含量(%w/w)。

[0568] 实施例1.8:测定pH

[0569] 使用pH玻璃电极测量所有pH值,将其归一化至25℃。

[0570] 在使用前仔细冲洗并校准pH玻璃电极(具有温度补偿)。当样品为液体形式时,则直接在25℃的液体溶液中测量pH值。当样品为粉末时,将10克粉末在室温下剧烈搅拌下溶于90mL的脱盐水中。然后在25℃下测量溶液的pH值。

[0571] 实施例1.9:测定粉末的水含量

[0572] 食物产品的水分含量根据ISO 5537:2004(经干燥的牛奶-水分含量的测定(参考方法),Dried milk-Determination of moisture content(Reference method))测得。

[0573] 实施例1.10:测定钙、镁、钠、钾、磷的量(ICP-MS方法)

[0574] 钙、镁、钠、钾和磷的总量使用以下步骤确定:首先使用微波消解来分解样品,然后使用ICP设备测定矿物质的总量。

[0575] 仪器:

[0576] 微波来自Anton Paar,ICP为来自PerkinElmer Inc.的Optima 2000DV。

[0577] 材料:

[0578] 1M HNO_3

[0579] 在2%HNO_3中的钇

[0580] 在5%HNO_3中的钙、镁、钠、钾和磷的合适标准溶液

[0581] 预处理:

[0582] 称出一定量的粉末,然后将其转移到微波消解管中。加入5mL 1M HNO_3。按照微波说明,在微波中消解样品。将消解后的管子放在通风橱中,移开盖子,使挥发性烟雾蒸发。

[0583] 测量步骤:

[0584] 使用已知量的Milli-Q水将预处理后的样品转移至DigiTUBE。向消解管中加入2%HNO_3中的钇溶液(每50mL稀释样品加入约0.25mL),使用Milli-Q水稀释至已知体积。使用制造商描述的步骤在ICP上分析样品。

[0585] 通过使用Milli-Q水将10mL 1M HNO_3和在2%HNO_3中的0.5mL钇的溶液的混合物稀释至最终体积100mL来制备盲样品。

[0586] 制备至少3个标准样品,其浓度为预期的样品浓度。

[0587] 实施例1.11:测定糠氨酸值:

[0588] 糠氨酸值的测定方法如Guerra-Hernandez等,Maillard Reaction Evaluation by Furosine Determination During Infant Cereal Processing,Journal of Cereal Science 1999,29:171-176所述,蛋白质总量根据实施例1.1进行测定。以mg肌酐/100g蛋白质为单位来表示糠氨酸值。

[0589] 实施例1.12:测定液体中BLG的结晶度

[0590] 以下方法用于测定pH为5～6的液体中BLG的结晶度。

[0591] a)将10mL有关液体样品转移到装有0.45μm孔径CA膜的Maxi-Spin过滤器中;

[0592] b)立即以1500g旋转过滤器5分钟,将离心机保持在2℃;

[0593] c)将2mL冷Milli-Q水(2℃)加入旋转过滤器的渗余物侧,立即将过滤器以1500g旋转5分钟,同时保持离心机冷却为2℃,收集渗透物(渗透物A),测量体积,使用实施例1.2所述的方法通过HPLC测定非聚集BLG的浓度;

[0594] d)将4mL 2M NaCl加入过滤器的渗余物侧,迅速搅拌,使混合物在25℃下静置15分钟;

[0595] e)立即以1500g的转速旋转过滤器5分钟,收集渗透物(渗透物B);

[0596] f)使用实施例1.2中所述的方法测定渗透物A和渗透物B中非聚集BLG的总重量,将结果转化为非聚集BLG的总重量,取代重量百分比;渗透物A中非聚集BLG的重量称为$m_{渗透物A}$,渗透物B中非聚集BLG的重量称为$m_{渗透物B}$;

[0597] g)液体中的BLG的结晶度如下确定:

[0598] 结晶度＝$m_{渗透物B}/(m_{渗透物A}+m_{渗透物B})*100\%$

[0599] 实施例1.13:测定干燥粉末中BLG的结晶度

[0600] 此方法用于测定干燥粉末中BLG的结晶度。

[0601] a)将5.0克粉末样品与20.0克冷Milli-Q水(2℃)混合,在2℃下静置5分钟;

[0602] b)将液体样品转移到带有0.45μm CA膜的Maxi-Spin过滤器中;

[0603] c)立即以1500g的转速旋转过滤器5分钟,将离心机保持在2℃;

[0604] d)在旋转过滤器的渗余物侧添加2mL冷Milli-Q水(2℃),然后立即以1500g旋转过滤器5分钟,收集渗透物(渗透物A),测量体积,使用实施例1.2所述的方法通过HPLC测定非聚集BLG浓度,将结果转化为非聚集BLG的总重量,取代重量百分比。渗透物A中非聚集BLG的重量称为$m_{渗透物A}$;

[0605] f)然后使用下式计算粉末中BLG的结晶度:

[0606] $$结晶度=\frac{m_{总BLG}-m_{渗透物A}}{m_{总BLG}}*100\%$$

[0607] 其中,$m_{总BLG}$是步骤a)的粉末样品中非聚集BLG的总量。

[0608] 如果粉末样品的非聚集BLG总量未知,则可如下测定:将另一个5g粉末样品(来自同一粉末源)悬浮在20.0克Milli-Q水中,通过加入NaOH水溶液将pH值调节至7.0,在搅拌下使混合物在25℃下放置1小时,最后使用实施例1.2测定粉末样品的非聚集BLG的总量。

[0609] 实施例1.14:测定UF渗透电导率

[0610] 将15mL样品转移至截留3kDa(3000NMWL)的Amicon Ultra-15离心过滤器中,以4000g离心20～30分钟,或直至足够量的UF渗透物积累在过滤器单元的底部以测量电导率。离心后立即测量电导率。样品处理和离心在样品来源的温度下进行。

[0611] 实施例1.15:测定粉末中干燥的BLG晶体

[0612] 可通过以下方法测定粉末中是否存在干燥的BLG晶体:

[0613] 以2份水与1份粉末的重量比,将待分析的粉末样品重悬在温度为4℃的脱盐水中,轻轻混合,然后在4℃下重新水合1小时。

[0614] 通过显微镜检查再水合的样品以鉴定晶体的存在,优选使用平面偏振光检测双折射。

[0615] 分离晶体状物质,进行X射线晶体学分析,验证晶体结构的存在,优选地还验证其晶格(空间群和晶胞尺寸)对应于BLG晶体的晶格。

[0616] 分析分离的晶体状物质的化学组成,以验证其固体主要由非聚集BLG组成。

[0617] 实施例1.16:测定乳糖总量

[0618] 乳糖的总量根据ISO 5765-2:2002(IDF 79-2:2002)“经干燥的牛奶、干冰混合物和经加工的奶酪-乳糖含量的测定(Dried milk,dried ice-mixes and processed cheese-Determination of lactose content)-第2部分:利用乳糖的半乳糖部分的酶促方法(Enzymatic method utilizing the galactose moiety of the lactose)”测得。

[0619] 实施例1.17:测定碳水化合物总量

[0620] 通过使用Sigma Aldrich总碳水化合物测定试剂盒(货号MAK104-1KT)确定碳水化合物含量,其中,将碳水化合物水解并转化为糠醛和羟基糠醛,然后转化为色原,在490nm进行分光光度法监测。

[0621] 实施例1.18:测定脂质总量

[0622] 脂质含量根据ISO 1211:2010(脂肪含量的测定-Röse-Gottlieb重量法,Determination of Fat Content-Röse-Gottlieb Gravimetric Method)测得。

[0623] 实施例1.19:测定白利糖度(brix)

[0624] 使用精制水(polished water)(反渗透过滤后的水,电导率为至多0.05mS/cm)校准过的PAL-α数字手持折射仪(Atago)来测量白利糖度。

[0625] 将约500μL样品转移到仪器的棱镜表面,然后开始进行测量。读取并记录测量值。

[0626] 乳清蛋白溶液的白利糖度与固体总量(TS)成正比,TS(%w/w)约为白利糖度*0.85。

[0627] 实施例1.20:测定菌落形成单位数

[0628] 根据ISO 4833-1:2013(E):食品和动物原料的微生物-微生物计数的水平方法-30℃下的菌落计数技术(Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the enumeration of microorganisms-Colony-count technique at 30℃),测定每克样品的菌落形成单位数。

[0629] 实施例1.21:测定BLG、ALA和CMP的总量

[0630] 该程序是液相色谱(HPLC)方法,用于定量分析蛋白质(例如ALA、BLG和CMP)以及组合物中的其他蛋白质。与实施例1.2的方法不同,本方法还测量聚集存在的蛋白质,因此提供了有关组合物中蛋白质种类总量的量度。

[0631] 分离方式为体积排阻色谱法(SEC),所述方法使用6M胍盐酸盐缓冲液作为样品溶剂和HPLC流动相。巯基乙醇用作还原剂,以还原蛋白质或蛋白质聚集体中的二硫化物(S-S),以产生展开的单体结构。

[0632] 通过在流动相中溶解10mg蛋白质当量可轻松实现样品制备。

[0633] 将2个TSK-GEL G3000SWXL(7.7mm×30.0cm)色谱柱(GPC色谱柱)和保护柱串联放置,以实现原料中主要蛋白质的充分分离。

[0634] 洗脱的分析物通过紫外检测(280nm)进行检测和定量。

[0635] 设备/材料:

[0636] 1.带有手动密封冲洗的HPLC Pump 515(Waters);

[0637] 2.HPLC泵控制模块II(Waters);

[0638] 3.自动进样器717(Waters);

[0639] 4.双吸光度检测器2487(Waters);

[0640] 5.能够生成定量报告的计算机软件(Empower 3,Waters);

[0641] 6.分析柱:2个TSK-GEL G3000SWXL(7.8×300mm,P/N:08541);

[0642] 保护柱:TSK-保护柱SWxL(6.0×40mm,P/N:08543);

[0643] 7.超声波浴(Branson 5200);

[0644] 8.25mm针筒过滤器,具有0.2μm醋酸纤维素膜。(514-0060,VWR)。

[0645] 程序:

[0646] 流动相:

[0647] A.储备缓冲液

[0648] 1.称取56.6g Na_2HPO_4、3.5g NaH_2PO_4和2.9g EDTA,加入1000mL烧杯中。溶于800mL水;

[0649] 2.测量pH值,如有必要,用HCl(降低pH)或NaOH(增加pH)调节至7.5±0.1;

[0650] 3.转移到1000mL容量瓶中,用水稀释至刻度。

[0651] B.6M盐酸胍流动相

[0652] 1.称取1146g盐酸胍,加入2000mL烧杯中,然后加入200mL储备缓冲液(A);

[0653] 2.用水稀释该溶液至约1600mL,同时用磁力搅拌棒混合(50℃);

[0654] 3.用NaOH将pH调节至7.5±0.1;

[0655] 4.转移到2000mL容量瓶中,用水稀释至刻度;

[0656] 5.使用带有0.22μm膜过滤器的溶剂过滤设备进行过滤。

[0657] 校准标准品

[0658] 每种要定量的蛋白质的校准标准品通过以下方式制备:

[0659] 1.准确称量(称至0.01mg)约25mg的蛋白质参考标准品至10mL容量瓶中,溶于10mL水中,这是蛋白质的蛋白质储备标准溶液(S1);

[0660] 2.吸取200μL S1至20mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,这是低(浓度)工作标准溶液WS1;

[0661] 3.吸取500μL S1至10mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,这是标准溶液WS2;

[0662] 4.吸取500μL S1至5mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,这是标准溶液WS3;

[0663] 5.移取750μL S1至5mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,这是标准溶液WS4;

[0664] 6.吸取1.0mL S1至5mL容量瓶中,用流动相稀释至刻度,这是高(浓度)工作标准溶液WS5;

[0665] 7.使用带刻度的一次性移液器,将1.5mL WS1至WS5转移到单独的小瓶中,在每个小瓶中加入10μL 2-巯基乙醇并加盖瓶盖,将溶液涡旋10秒钟,让标准品在环境温度下放置约1小时。

[0666] 8.使用0.22μm醋酸纤维素注射过滤器过滤标准溶液。

[0667] 使用凯氏定氮法(N×6.38)测量蛋白质的纯度,使用HPLC测定标准溶液WS5的面积%。

[0668] 蛋白质(mg)=“蛋白质标准品重量”(mg)×P1×P2;

[0669] P1=P%(凯氏定氮法);

[0670] P2=蛋白质面积%(HPLC)。

[0671] 样品制备

[0672] 1.称取25mg当量蛋白质的原始样品至25mL容量瓶中;

[0673] 2.添加约20mL的流动相,使样品溶解约30分钟;

[0674] 3.加入流动相至刻度,向25mL样品溶液中加入167μL 2-巯基乙醇;

[0675] 4.超声处理约30分钟,然后将样品在环境温度下放置约1.5小时;

[0676] 5.混合溶液,使用0.22μL醋酸纤维注射过滤器过滤。

[0677] HPLC系统/色谱柱

[0678] 平衡色谱柱

[0679] 1.串联连接GPC保护柱和两个GPC分析柱,新色谱柱通常装有磷酸盐缓冲液;

[0680] 2.在30至60分钟内,以0.1至0.5mL/min的速度使水逐步流过新色谱柱,继续冲洗约1小时;

[0681] 3.逐渐将流速从0.5mL/min降低至0.1mL/min,更换为贮存容器中的流动相;

[0682] 4.在30至60分钟内,将泵流量从0.1mL/min逐渐增加至0.5mL/min,以避免压力冲击,保持在0.5mL/min;

[0683] 5.进样10个样品,使色谱柱饱和,等待峰洗脱,这将有助于调节色谱柱,进行此步骤时无需在下一次进样之前等待每次进样完成;

[0684] 6.用流动相平衡至少1小时。

[0685] 计算结果

[0686] 通过将相应标准蛋白的峰面积与样品的峰面积进行比较,来进行待定量蛋白质(例如α-乳清蛋白、β-乳球蛋白和酪蛋白巨肽)的含量的定量测定。结果表示为g特定蛋白质/100g原始样品,或表示为特定蛋白质相对于原始样品重量的重量百分比。

[0687] 实施例2:通过结晶除去β-乳球蛋白来富集乳清中的α-乳白蛋白

[0688] 方案:

[0689] 使用1.2μm的膜,对来自标准干酪生产过程的甜乳清中的缺乳糖的UF渗余物进行微滤,随后用作BLG结晶过程的原料。使用46mill间隔的Koch HFK～328型膜的超滤装置,对甜乳清原料进行调节,进料压力为1.5～3.0bar,原料浓度为21％TS(固体总量)±5,精制水(通过反渗透过滤的水)作为渗滤介质。然后通过加入HCl调节pH值,得到pH约5.40。继续进行渗滤,直至在20分钟的时间内渗余物的电导率下降到0.03mS/cm以下。然后将渗余物浓缩至约30％TS(相对于浓缩渗余物的总重量,蛋白质总量为约23.1％)。在10～12℃的温度下,制备浓缩渗余物。将浓缩渗余物的样品在3000g下离心5分钟,但没有形成可见的沉淀物。对上清液进行HPLC分析。原料的组成见表1。

[0690] 应注意,在本实施例中,所有特定蛋白质(例如BLG和ALA)的浓度均与非聚集蛋白质的浓度有关,根据实施例1.2进行测量。

[0691] 用0.5g/L由自发BLG结晶获得的纯BLG晶体材料(如PCT申请PCT/EP2017/084553实施例3中所述)接种浓缩渗余物。通过在MilliQ水中洗涤BLG晶体浆液5次,在每次洗涤后收集BLG晶体,来制备晶种材料。洗涤后,将BLG晶体冷冻干燥,用研杵和研钵研磨,然后通过200μm的筛子。因此,晶种的粒径小于200μm。

[0692] 将浓缩的渗余物转移至300L的结晶罐中,在结晶罐中将渗余物冷却至约2℃,保持在该温度下缓慢搅拌过夜。第二天早晨,将冷却的浓缩渗余物样品转移到试管中,目视和通过显微镜进行检查。迅速沉淀的晶体显然已形成了一整夜。将包含晶体和母液的混合物的实验室样品在冰水浴中进一步冷却至0℃。通过在3000g下离心5分钟来分离母液和晶体,取上清液和沉淀物的样品进行HPLC分析。将晶体在冷精制水中洗涤一次,然后在冷冻干燥之前再次离心。

[0693] 表1:原料的选定成分的浓度(标准化为95％w/w总固体)

[0694]

原料被标准化为95% TS	
蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	17.7
BLG	51.6
其他蛋白质，包括CMP	30.7
其他组分（% w/w，相对于标准化原料的总重量）	
Ca	0.357
K	0.200
Mg	0.058
Na	0.045
P	0.280
脂肪	5.6
蛋白质	79

[0695] 蛋白质分析：

[0696] 使用标准品的TSK-HPLC进行蛋白质定量，使用凯氏定氮法以6.38的系数测量蛋白质总浓度。

[0697] 通过HPLC定量BLG相对产率：

[0698] 通过加入精制水使所有样品均受到相同程度的稀释，将样品通过0.22μm过滤器过滤。将相同体积的各样品进样到具有PhenomenexJupiter® 5μm C4 300Å、LC色谱柱250×4.6mm、EA的HPLC系统。在214nm处检测。

[0699] 样品在以下条件下运行：

[0700] 缓冲液A:MilliQ水，0.1%w/w TFA

[0701] 缓冲液B:HPLC级乙腈，0.085%w/w TFA

[0702] 柱温:40℃

[0703] 流量:1mL/min

[0704] 梯度:0～30分钟82～55%A和18～45%B;30～32分钟55～10%A和45～90%B;32.5～37.5分钟10%A和90%B;38～48分钟10-82%A和90-18%B。

[0705] 数据处理：

[0706] 由于所有样品均以相同的方式处理，因此我们可直接比较BLG峰的面积以获得相对产率。由于晶体仅包含BLG，所有样品均以相同的方式进行处理，因此所有样品中的α-乳白蛋白(ALA)浓度以及ALA面积应相同，因此在计算相对产率时，将结晶前和结晶后的ALA面积用作校正因子(cf)。

[0707] $$cf_{\alpha} = \frac{\text{ALA 的面积}_{结晶前}}{\text{ALA 的面积}_{结晶后}}$$

[0708] 相对产率通过下式计算：

[0709] $$产率_{BLG} = \left(1 - \frac{cf_{\alpha} \times BLG\text{的面积}_{结晶后}}{BLG\text{的面积}_{结晶前}}\right) \times 100$$

[0710] 母液中其他蛋白质的富集：

[0711] 基于质量守恒以及已知BLG的相对除去量，假设除BLG外没有其他蛋白质被去除，测量原料中的蛋白质组成，计算母液中的蛋白质组成。如此：

[0712] $$m_{晶体形式的BLG} = m_{BLG原料} \times \frac{产率_{BLG}}{100}$$

[0713] $m_{蛋白质ML} = m_{蛋白质原料} - m_{晶体形式的BLG}$

[0714] $m_{ALA原料} = m_{ALA\ ML}$

[0715] $$\%ALA_{原料} = \frac{m_{ALA\ 原料}}{m_{蛋白质原料}} \times 100$$

[0716] $$\%ALA_{ML} = \frac{m_{ALA\ 原料}}{m_{蛋白质ML}} \times 100$$

[0717] $$\%富集_{ALA} = \frac{\%ALA_{ML} - \%ALA_{原料}}{\%ALA_{原料}} \times 100\%$$

[0718] 结果：

[0719] 图1显示了从甜乳清中结晶BLG之前和之后的叠加色谱图。“结晶前”样品用黑色实线表示，“结晶后”样品用虚线表示。显然，BLG的浓度已大大降低，使用如前所述的产率计算发现，除去了64.5％的BLG。测得％ALA_{ML}为29.2％，得到ALA的富集为50％。ALA的产率接近100％，因为用BLG晶体几乎没有除去任何ALA。图2显示了BLG晶体的照片，图3显示了溶解的晶体的色谱图，表明几乎没有任何非BLG蛋白被BLG晶体除去。

[0720] 表2显示了计算出的母液蛋白质组成。

[0721] 表2：计算出的母液的蛋白质组成

[0722]

母液被标准化为 95% TS	
蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	29.2
BLG	27.5
其他蛋白质，包括 CMP	43.3

[0723] 结论：

[0724] 出乎意料地，本实施例证明，可通过在粗乳清蛋白浓缩物中选择性地使BLG结晶来制备富含ALA的乳清蛋白组合物，随后除去BLG晶体，相对于蛋白质总量，所述粗乳清蛋白浓缩物中包含超过48％的非BLG蛋白质。ALA的产率接近100％。这一发现为工业牛奶蛋白质分离提供了一种新方法，所述方法以温和的方式从ALA和其他蛋白质组分中除去了BLG，更好地避免了长时间暴露于高温和有问题的化学物质中。

[0725] 实施例3：通过结晶除去BLG从来自甜乳清的乳清蛋白浓缩缩物中富集ALA和其他乳清蛋白种类

[0726] 方案：

[0727] 将来自标准干酪生产过程的甜乳清中的缺乳糖的UF渗余物通过1.2μm过滤器过滤，然后使用Synder FR膜进行减脂。然后如实施例2中所述制备渗透物以进行结晶，不同之

处在于不添加晶种。原料的组成示于表3。然后如实施例2所述地处理数据。

[0728] 表3:原料的选定成分的浓度(标准化为95%w/w总固体)

[0729]

原料标准化为 95% TS 蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	12.2
BLG	70.0
其他蛋白质，包括 CMP	17.8
其他组分（% w/w，相对于标准化原料的总重量）	
Ca	0.387
K	0.204
Mg	0.066
Na	0.051
P	0.174
脂肪	BDL
蛋白质浓度	89

[0730] 应注意,在本实施例中,所有特定蛋白质(例如BLG和ALA)的浓度均与非聚集蛋白质的浓度有关,根据实施例1.2进行测量。

[0731] 结果:

[0732] 在图4显示了原料和母液的蛋白质组成。显然,已除去了大部分BLG,如实施例2所述地计算产率,得出BLG的产率为82%。得到%ALA_{ML}为29.6%,得到143%的富集。母液的蛋白质组成示于表4。

[0733] 表4:计算出的母液的蛋白质组成

[0734]

母液被标准化为 95% TS 蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	29.6
BLG	28.6
其他蛋白质，包括 CMP	41.8

[0735] 实施例4:通过结晶除去BLG从来自酸乳清的乳清蛋白浓缩缩物中富集ALA和其他乳清蛋白种类

[0736] 方案:

[0737] 将酸乳清用作原料,按实施例2所述地进行处理。如实施例2所述地对原料进行结晶,按实施例2所述地对所得产物进行表征和分析。表5显示了原料的选定成分的浓度。

[0738] 表5:原料的选定成分的浓度(标准化为95%w/w总固体)

[0739]

将原料标准化为95% TS 蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	24.0
BLG	63.6
其他蛋白质，包括CMP	12.4
其他组分（% w/w，相对于标准化原料的总重量）	
Ca	0.289
K	0.131
Mg	0.020
Na	0.394
P	0.327
脂肪	5.1
蛋白质浓度	79

[0740] 在图5显示了原料和母液的蛋白质组成。显然,已除去大部分BLG。晶体分离的BLG产率测得为70.3%。如果在结晶之前总蛋白的浓度更高,则产率会更高。在本实施例中,ALA富集了81%,得到ALA百分比为43.4。剩余乳清蛋白溶液(母液)的蛋白质组成如表6所示。

[0741] 表6:计算出的母液的蛋白质组成

[0742]

母液被标准化为95% TS 蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	43.4
BLG	34.2
其他蛋白质，包括CMP	22.4

[0743] 应注意,在本实施例中,所有特定蛋白质(例如BLG和ALA)的浓度均与非聚集蛋白质的浓度有关。

[0744] 除ALA的水平增加以外,回收的母液还含有富含磷脂的乳清脂肪和原始乳清蛋白原料的免疫球蛋白。这些被认为是婴儿营养中具有营养价值的成分,例如对于婴儿的认知功能和免疫系统的发展。因此,由回收的母液制备的乳清蛋白组合物特别适合作为人源化婴儿营养产品的成分。

[0745] 实施例5:通过结晶除去BLG从来自血清蛋白的乳清蛋白浓缩缩物中富集ALA和其他乳清蛋白种类

[0746] 使用脱脂牛奶作为原料,通过Synder FR膜除去酪蛋白。然后如实施例2所述地制备渗透物以进行结晶,也如实施例2地所述处理数据。

[0747] 参见表7。

[0748] 表7:原料的选定成分的浓度(标准化为95%w/w总固体)

[0749]

原料标准化为95% TS 蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	23.5
BLG	66.7
其他蛋白质	9.8
其他组分（% w/w，相对于标准化原料的总重量）	
Ca	0.292
K	BDL
Mg	0.042
Na	BDL
P	0.149
脂肪	BDL
蛋白质浓度	91

[0750] 应注意,在本实施例中,所有特定蛋白质(例如BLG和ALA)的浓度均与非聚集蛋白质的浓度有关。

[0751] 同样地,观察到已除去大部分BLG。BLG的产率测得为70.0%。如果浓缩的渗余物的固体总量在结晶之前和/或期间更高,则产率将更高。在本实施例中,ALA富集了88%,得到母液中ALA含量相对于蛋白质总量为44.1%w/w。表8显示了计算出的母液蛋白质组成。

[0752] 表8:计算出的母液的蛋白质组成

[0753]

母液被标准化为95% TS 蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）	
ALA	44.1
BLG	37.5
其他蛋白质	18.4

[0754] 结论:

[0755] 使用本发明的方法可从所有测试的原料中显著富集蛋白质的ALA部分,从而提供富含ALA的乳清蛋白产物,其可原样用作ALA成分或可进行进一步富集。

[0756] 实施例6:UF-DCF辅助结晶

[0757] 通过对脱脂牛奶进行微滤(使用Synder FR膜进行微滤)制得奶清,将其用作实施例2中所述方法的原料,不同之处在于渗滤期间的pH为5.92而不是5.40,最终总固体为20% w/w。

[0758] 对原料(原料组成参见表9)进行调节后,将其转移至300L结晶罐中,首先将pH调节至pH 5.80,将温度保持在约10～12℃。调节pH之后,添加晶种材料,所述晶种材料以与实施例2中所述相同的方式生产,但其源自非自发性结晶生产。原料以浓度为0.5克晶种材料/升原料进行接种。接种后,将冷却罩的温度设为5℃,将pH缓慢调节至5.50,使其结晶约一小时,然后将DCF(动态错流过滤)连接至结晶槽,如图6所示。将来自DCF的渗余物放回到结晶罐,同时渗透物用作装有46mil间隔的Koch HFK-328型膜的超滤装置的原料。DCF单元装有孔径为500nm的Kerafol陶瓷膜。跨膜压力(TMP)设置为0.4巴,膜的旋转速度为32Hz。

[0759] 将来自DCF的渗余物放回到结晶罐,而渗透物则用作配备有46mil间隔的Koch HFK-328型膜的UF(超滤)装置的原料。在超滤装置中,使温度升高至但不超过12℃。调节渗

滤水的添加量,以使从超滤装置出来并返回结晶罐的渗余物为约21％TS,同时从母液中除去矿物质。母液的渗滤继续进行,直至渗透物和渗滤水之间的电导率差低于50mS/cm。此时,调整渗滤水的量,以使渗余物为约30％TS。母液中的固体总量随BLG作为晶体除去而减少,此种多余水和矿物质的连续除去可以提高BLG的产率,因为BLG结晶过程中非BLG蛋白的浓度似乎对BLG的溶解度影响有限。表10列出了来自DCF(DCF渗透物)的母液的估计组成。最初的300L原料被减少到约100L的母液。基于质量守恒,BLG的相对产率估计为94％,相对于原料中ALA浓度,相对于总蛋白质的ALA浓度估计增加267％。

[0760] 表9:原料的选定成分的浓度(标准化为95％w/w TS)

[0761]

原料标准化为 95% TS		
蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）		
ALA		23.5
BLG		66.7
其他蛋白质		9.8
其他组分（% w/w，相对于标准化原料的总重量）		
Ca		0.292
K		BDL
Mg		0.042
Na		BDL
P		0.149
脂肪		BDL
蛋白质		91

[0762] 应注意,在本实施例中,所有特定蛋白质(例如BLG和ALA)的浓度均与非聚集蛋白质的浓度有关,根据实施例1.2进行测量。

[0763] 表10:估计的母液的蛋白质组成

[0764]

母液被标准化为 95% TS		
蛋白质组成（% w/w，相对于蛋白质总量）		
ALA		63.2
BLG		10.5
其他蛋白质		26.3

[0765] 结论:

[0766] 通过连续地从发生BLG结晶的基质中除去多余的矿物质和水,可显著改善ALA的富集,并且该过程可在低温下完成。

[0767] 实施例7:通过酸化解决母液的处理问题

[0768] 发明人先前已观察到,母液的直接浓缩和喷雾干燥引起结垢问题和膜阻塞,需要大量的热处理以使微生物负荷达到可接受的水平。由于所需的相对苛刻的热处理,所得的干燥粉末将具有较差的蛋白质溶解性。

[0769] 将母液的pH值从5.5调节到3.2。

[0770] 从类似于实施例3中概述的结晶中回收730kg母液,在5℃下储存过夜。回收的母液中含有约4.6％w/w蛋白质,化学组成如表11所示。通过缓慢添加稀磷酸将母液的pH值调节至3.2。进行该步骤以溶解残留的BLG晶体。根据实施例1.20分析初始pH下和pH调节后母液

的细菌分析,结果示于表12。

[0771] 表11:母液的选定成分的化学组成(标准化为95%总固体)

[0772]

组分	%w/w
蛋白质	85
Ca	0.59
Cl	0.75
脂肪	0.75
K	0.41
Mg	0.11
Na	0.10
P	0.30

[0773] 值得注意,观察到浊度从86.8NTU(在母液中)变为23.7NTU(在pH经调节的母液中)。

[0774] 在微滤步骤期间除去母液的细菌

[0775] 为了除去细菌,使pH为约3.2的母液通过0.8mm的陶瓷膜(Pall Membralox GP)。微滤步骤在约10℃的操作温度下进行,其中,跨膜压力为3.2巴,渗透流量固定为60L/h/膜。收集渗透物用于进一步处理。在MF步骤结束时,收集到的MF渗透物的浊度为约15.2 NTU。根据实施例1.20分析渗透物。

[0776] 超滤步骤期间的母液的处理

[0777] 使用48mil间隔的螺旋缠绕GR82PE UF膜(截留分子量为5kDa)过滤从微滤步骤收集的渗透物。在超滤步骤中,将母液浓缩至约16的白利糖度(约12%w/w的蛋白质)。为避免在过滤步骤中pH变化,添加了额外的磷酸。

[0778] 在此步骤中,实现了浓缩系数为3(收集到约185kg浓缩的MF渗透物)。如果继续过滤,可获得更高的浓缩系数。在本实施例中,原料的白利糖度和pH分别为约16.5和3.3,收集原料,将其送至喷雾干燥器。根据实施例1.20分析超滤步骤后在酸性pH下的母液。

[0779] 对pH经调节的浓缩母液进行干燥

[0780] 使用喷雾干燥器,对一部分pH经调节的浓缩母液进行干燥,入口温度为185℃,出口温度为约85℃。所得粉末(约15kg)的水含量为约4.0%w/w。根据实施例1.20分析微生物的含量。

[0781] 结果:

[0782] 从表12中可看出,添加酸以将母液的pH从约5.5调节至3.2,使得总平板计数减少了约10倍。此外,微滤步骤可成功除去细菌,因为渗透物的总平板计数减少至<1000CFU/g。喷雾干燥后,pH为3.2的最终母液粉末的总平板计数为10CFU/g。

[0783] 表12:每个处理步骤后的微生物浓度(CFU/g)

[0784]

	加酸之前	加酸之后	MF 步骤之后	UF 步骤之后	喷雾干燥之后(作为粉末)
总平板计数(CFU/g)	3,700,000	460,000	40	590	10

[0785] 此外,将pH调节至3.2后的母液在5℃下保存三天。总平板计数从460,000CFU/g减少到350,000CFU/g。保存前后样品总平板计数的减少表明,将母液保持在酸性pH值为3.2也

能抑制细菌生长。

[0786] 结论：

[0787] 为产生pH为3.2的母液粉末的酸化产生显著的细菌负荷降低。此外，母液的浊度从约87NTU降低到24NTU，这被认为是母液中BLG晶体溶解和/或微生物负荷降低的结果。

[0788] 此外，母液的微滤使得成功除去细菌。此外，使用pH为约3.2的最终粉末具有透明的外观，且浊度低于50NTU。因此，源自经调节的母液的酸性粉末可用于饮料和速溶饮料应用，例如用于儿科营养。

[0789] 实施例8：通过增加pH来解决母液的处理问题

[0790] 将pH为约5.5的400mL母液与稀释的KOH混合，得到pH为约7。使用Synder HFK328膜，在4巴的跨膜压力和约10℃的温度下，对pH经调节的母液进行过滤步骤，直至达到白利糖度6的固体含量。

[0791] 结果：

[0792] 在超滤步骤之后，相对于固体总量，母液含有89％的蛋白质。由于pH调节，因此没有遇到结垢问题或膜堵塞问题。如果将pH经调节的浓缩母液浓缩至更高的固体总量，则似乎适合干燥，或者可作为例如儿科营养食品或速溶饮料的成分直接使用而无需进一步改性。

[0793] 实施例9：进一步富集缩母液的ALA

[0794] 本实施例描述了母液的ALA的进一步富集。

[0795] 根据实施例5获得了蛋白质含量为约13.7％w/w的100L母液，将其与盐酸(8％w/v)混合，迅速混合以达到最终pH为4.3。然后，将pH调节后的母液在四阶段串联的超滤设备中使用5kDa UF膜通过超滤进行浓缩，浓缩至蛋白质含量为约22％w/w。然后，使pH经调节的浓缩母液通过管式换热器，在管式换热器中温度缓慢升高到64℃±1℃，然后通过保持在相同温度下的管，其长度等于停留时间6分钟。然后将溶液在第二个管式换热器中冷却至50℃，收集在装有搅拌桨的隔热桶中，搅拌桨以20r.p.m的速度旋转。在桶中平均停留10分钟后，将溶液以200L/小时的速度泵送通过连续的自动排渣式澄清器。用水冲洗澄清器后，定期排出沉淀的蛋白质级分。将沉淀的蛋白质级分悬浮在精制水中，通过添加NaOH水溶液(10％w/v)将pH调节至6.7使其溶解。

[0796] 通过使用5kDa膜的超滤将溶解的蛋白质级分浓缩至约25％w/w的固体总量，对其喷雾干燥。预期富含ALA的粉末包含：相对于蛋白质总量超过60％w/w的ALA，以及相对于粉末的固体总量至少85％的总蛋白含量。含水量为至多5％w/w。

[0797] 实施例10：含有富含ALA的乳清蛋白组合物的婴儿配方食品

[0798] 由实施例4或9的富含ALA的乳清蛋白粉来生产两种婴儿配方食品：A和B，其通过混合：

[0799] -来自实施例4(用于婴儿配方食品A)或实施例9(用于婴儿配方食品B)的6.8kg富含ALA的乳清蛋白粉；

[0800] -20.5kg食品级乳糖；

[0801] -152.7kg水；

[0802] -70kg超滤浓缩脱脂牛奶(9.0％w/w蛋白质、4.2％w/w乳糖、0.05％w/w脂肪、0.7％w/w灰分、14.7％w/w固体总量)；

[0803] -374kg脱脂牛奶的脱盐超滤渗透物;

[0804] -33.2kg植物脂肪混合物;

[0805] -15.1kg固体总量为71%的GOS糖浆;

[0806] -所需的微量营养素,包括维生素、核苷酸和多不饱和脂肪酸PUFA。

[0807] 将共混物均质化、巴氏灭菌、蒸发并喷雾干燥,得到118kg最终婴儿配方食品,其奶清蛋白/酪蛋白比例为约62/38,能量含量为约2000kJ/100克粉末。

[0808] 与基于标准乳清蛋白的普通婴儿配方食品相比,这两种婴儿配方食品均更好地模仿了人类母乳。与基于标准乳清蛋白的普通婴儿配方食品相比,这两种婴儿配方食品(尤其是婴儿配方食品B)均含有更高的ALA含量。婴儿配方食品A还含有富含磷脂的乳清脂肪和原始乳清蛋白原料的免疫球蛋白,它们被认为是婴儿营养食品中的营养价值成分,例如针对婴儿的认知功能和免疫系统的发展。

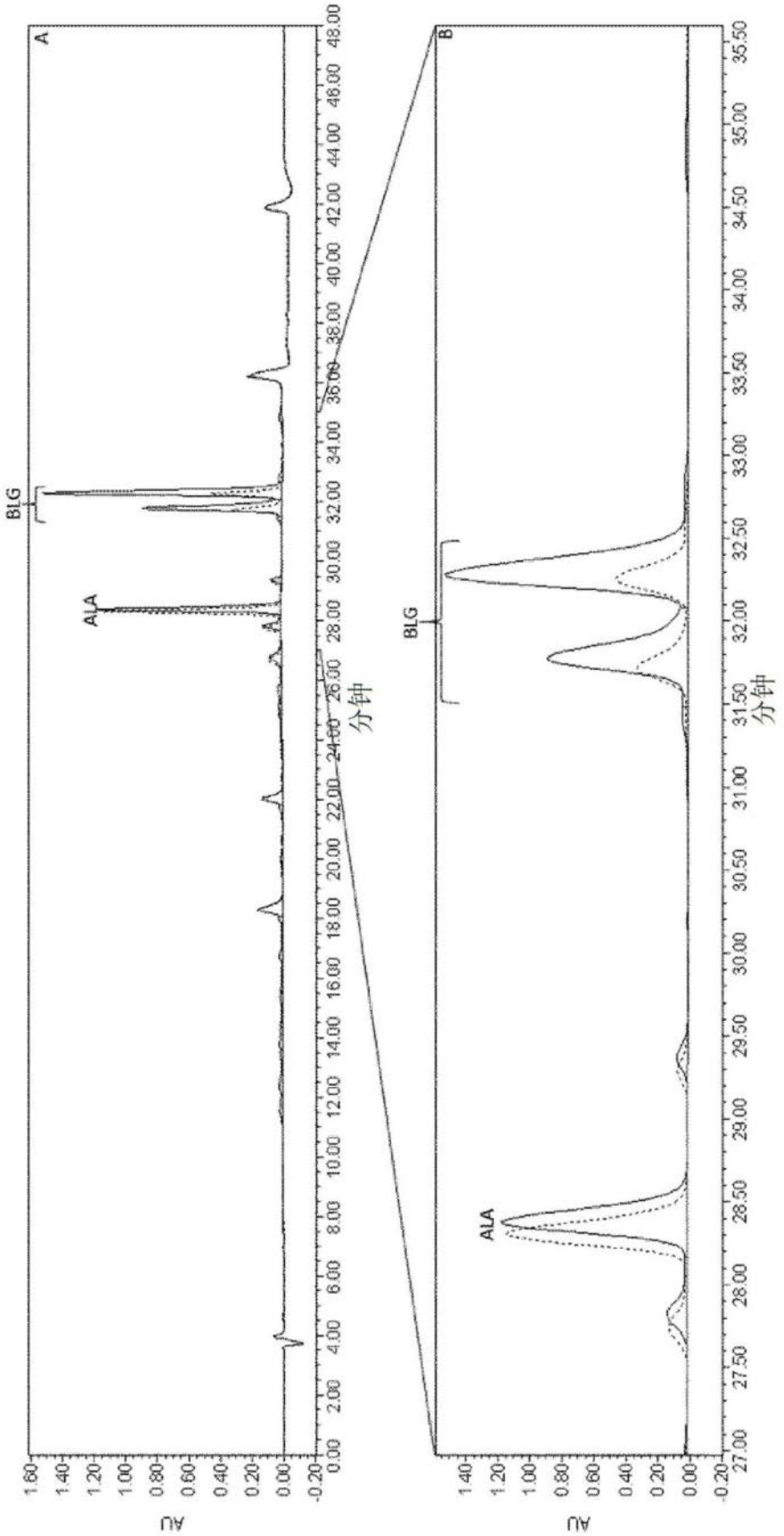


图1

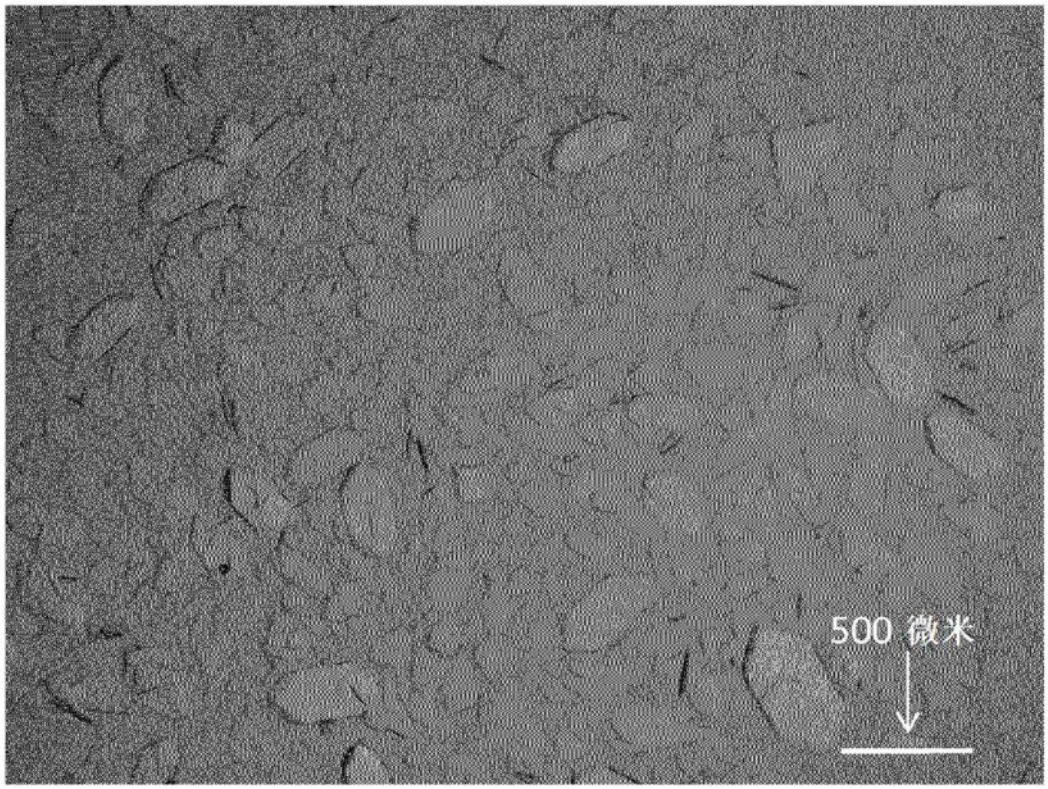


图2

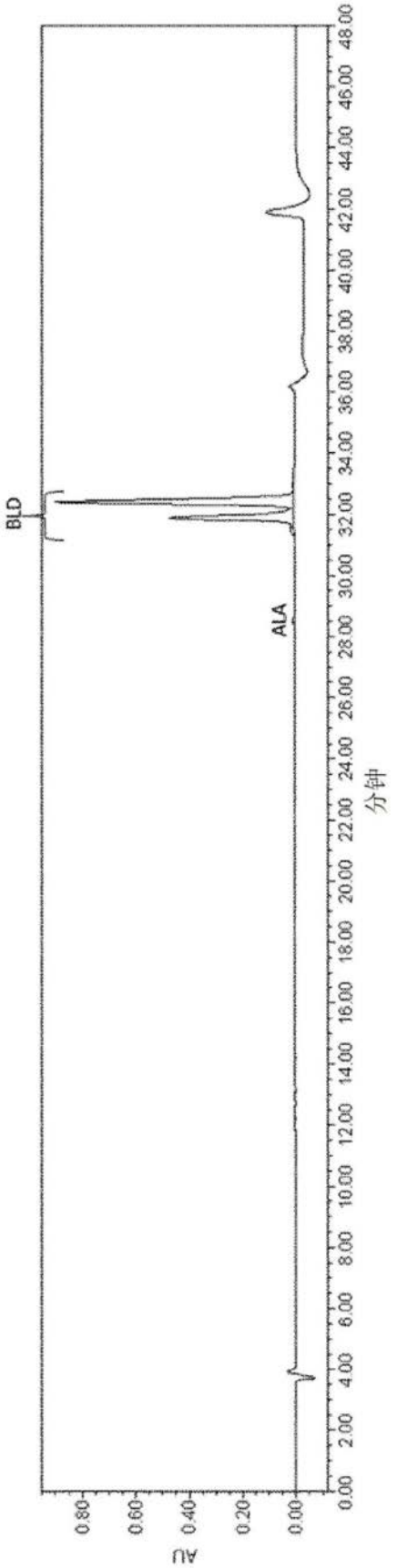

BLD
ALA
AU
0.00
0.20
0.40
0.60
0.80
分钟
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00
34.00
36.00
38.00
40.00
42.00
44.00
46.00
48.00

图3

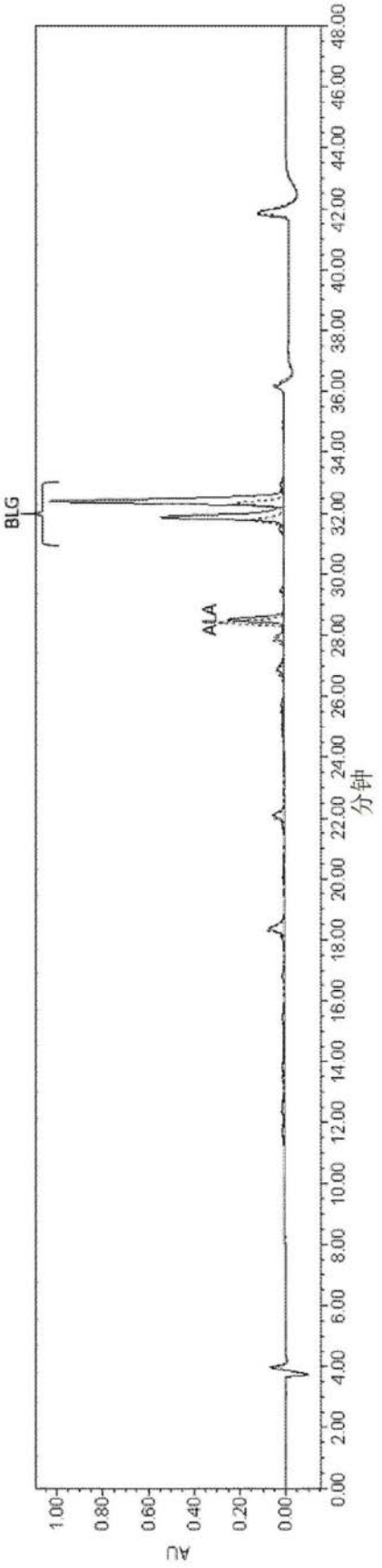

BLG
ALA
AU
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00
34.00
36.00
38.00
40.00
42.00
44.00
46.00
48.00
分钟

图4

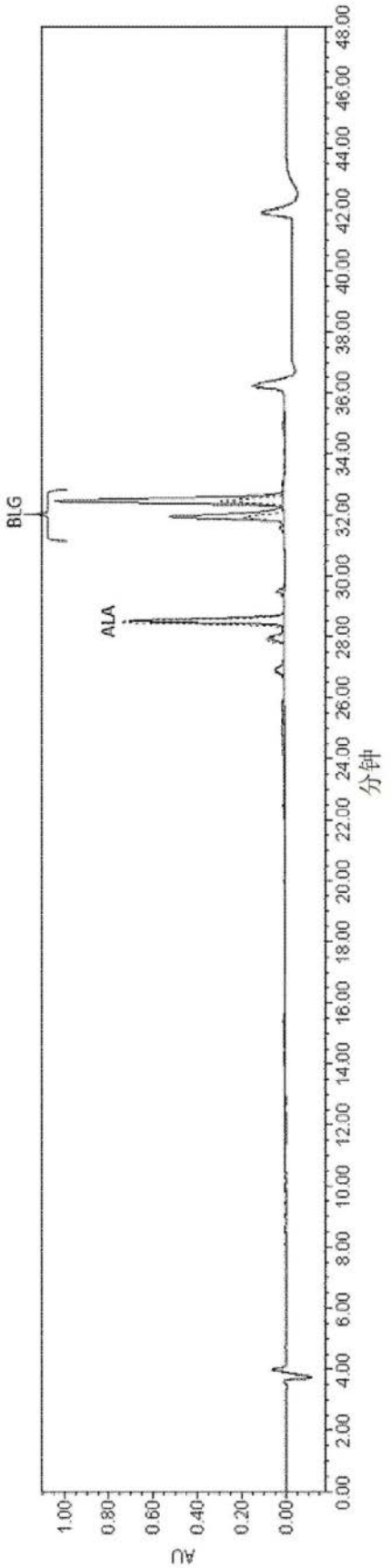

BLG
ALA
AU
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
12.00
14.00
16.00
18.00
20.00
22.00
24.00
26.00
28.00
30.00
32.00
34.00
36.00
38.00
40.00
42.00
44.00
46.00
48.00
分钟

图5

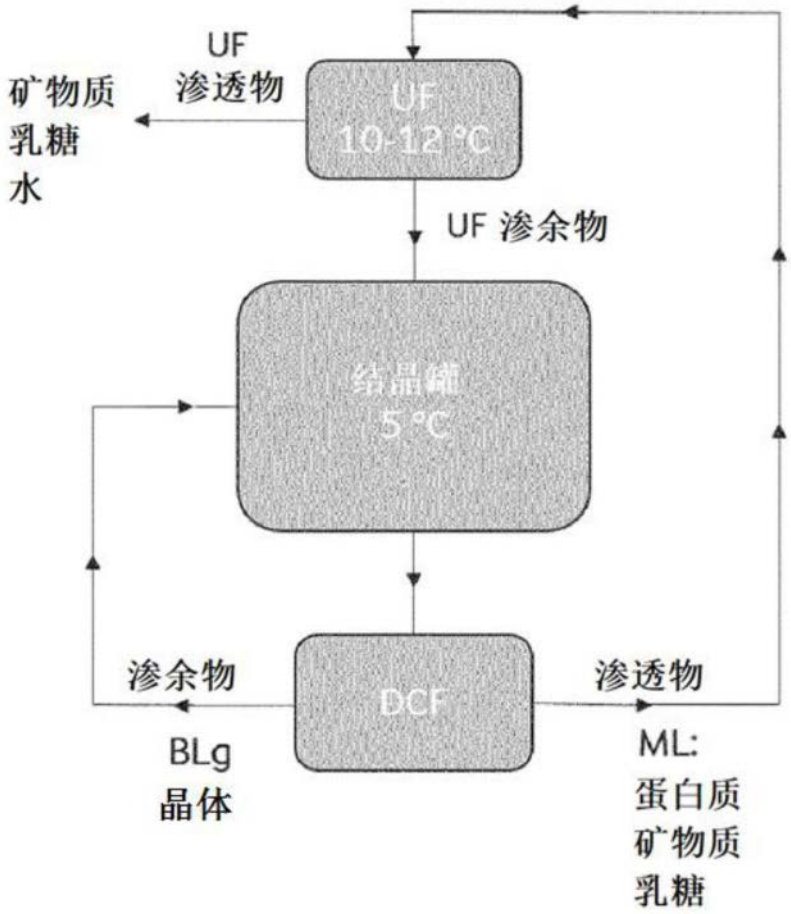

UF
渗透物
矿物质
乳糖
水
UF
10-12 °C
UF 渗余物
结晶罐
5 °C
渗余物
BLg
晶体
DCF
渗透物
ML:
蛋白质
矿物质
乳糖

图6