

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A23J 1/14 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02827073.8

[45] 授权公告日 2007 年 9 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100334963C

[22] 申请日 2002.11.20 [21] 申请号 02827073.8

[30] 优先权

[32] 2001.11.20 [33] US [31] 60/331,646

[32] 2002. 5.30 [33] US [31] 60/383,809

[86] 国际申请 PCT/CA2002/001775 2002.11.20

[87] 国际公布 WO2003/043439 英 2003.5.30

[85] 进入国家阶段日期 2004.7.13

[73] 专利权人 伯康营养科学(MB)公司

地址 加拿大温哥华

[72] 发明人 L·D·巴克 B·E·格林

X·雷

[56] 参考文献

US4704289A 1987.11.3

US5844086A 1998.12.1

审查员 王文庆

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李连涛 段晓玲

权利要求书 3 页 说明书 15 页 附图 1 页

[54] 发明名称

生产油籽蛋白分离物的连续方法

[57] 摘要

通过本发明方法可从油籽粗粉中连续生产油籽蛋白分离物,尤其是卡诺拉蛋白分离物,优选其具有至少为约 100%重量($N \times 6.25$)的高纯度水平。其中从油籽粗粉中连续浸提油籽蛋白质,所得蛋白质溶液经连续浓缩后,优选其蛋白质含量至少为约 200g/L,随后将浓缩的蛋白质溶液与低于 15℃ 的冷水连续混合,以形成蛋白质微胶粒,让该蛋白质微胶粒在沉降器中沉降,得到蛋白质微胶粒团(PMM),同时让上清液溢出沉降器。当 PMM 积累到所需程度时,可以将其与上清液分离并干燥。可以将上清液处理而回收得另一油籽蛋白分离物。

1. 一种制备蛋白分离物的方法，其特征在于：

(a) 在至少 5℃ 的温度下连续浸提油籽粗粉，以使油籽粗粉中的蛋白质溶解并形成 pH 为 5-6.8 的蛋白质水溶液，

所述连续浸提步骤按如下进行：

(i) 在 5℃-65℃ 温度下，把油籽粗粉与离子强度至少为 0.10 且 pH 为 5-6.8 的盐水溶液连续混合，并且

(ii) 通过管道将所述混合物连续输送，同时浸提油籽粗粉中的蛋白质，在至多 10 分钟的时间内，形成蛋白质含量为 5-40g/L 的蛋白质水溶液，

(b) 将所述的蛋白质水溶液与残留的油籽粗粉连续分离，

(c) 连续地输送所述的蛋白质水溶液使其通过选择性膜操作以使在保持离子强度基本恒定的同时，将蛋白质水溶液中的蛋白质浓度增加到至少 50g/L，从而得到浓缩的蛋白质溶液，

(d) 将所述的浓缩蛋白质溶液与温度低于 15℃ 的冷水连续混合，以使在水相中形成蛋白质微胶粒，

(e) 让所得混合物连续地流入沉降器中，同时让上清液溢出该沉降器，

(f) 让蛋白质微胶粒在沉降器中连续沉降，同时让上清液连续地从沉降器中溢出，直至无定形的、粘结的、凝胶的、面筋样的蛋白质微胶粒团在所述的沉降器中积累得到所需的量，并且

(g) 从沉降器中回收所述的蛋白质微胶粒团，所述蛋白质微胶粒团的蛋白质含量在干重下至少为 90 重量%，以 Kjeldahl 氮 $\times 6.25$ 确定。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述盐水溶液的离子强度为 0.15-0.8 且 pH 为 5.3-6.2，在至少 35℃ 温度、油籽粗粉在盐水溶液中的浓度为 5-15% w/v 下进行所述连续混合，并且所述蛋白质水溶液的蛋白质浓度为 10-30 g/L。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于增加所述蛋白质浓度到至少为 200 g/L，而且冷水的温度低于 10℃。

4. 如权利要求 3 所述的方法, 其特征在于增加所述蛋白质浓度到至少为 250 g/L。

5. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于所述浸提步骤使用的盐水溶液的离子强度至少为 0.10, 而且 pH 为 3-5 或者 6.8-9.9; 而且蛋白质水溶液与残留油籽粗粉分离后, 调节所述蛋白质水溶液的 pH 为 5-6.8。

6. 如权利要求 5 所述的方法, 其特征在于所述浸提步骤使用的盐水溶液的离子强度为 0.15-0.8。

7. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于所述油籽粗粉是卡诺拉油籽粗粉, 并且在所述的蛋白质水溶液与残留的卡诺拉油籽粗粉分离后, 连续进行蛋白质水溶液的脱色步骤。

8. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于通过渗滤蛋白质水溶液来进色脱色步骤。

9. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于通过连续地将色素吸附剂与蛋白质水溶液混合, 随后连续地从蛋白质水溶液中除去色素吸附剂来进色脱色步骤。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于所述油籽粗粉经水连续浸提, 随后向所得的蛋白质水溶液中连续地加入盐, 以使蛋白质水溶液的离子强度至少为 0.10。

11. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法, 其特征在于将所述的浓缩蛋白质溶液加热到至少 20℃ 温度, 以降低浓缩的蛋白质溶液的粘度, 但不超过使浓缩蛋白质溶液不能形成微粒的温度。

12. 如权利要求 11 所述的方法, 其特征在于将所述的浓缩蛋白质溶液加热到 25℃-40℃ 温度。

13. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法, 其特征在于将所述的浓缩蛋白质溶液与冷水连续混合, 将浓缩的蛋白质溶液稀释 15 倍或更少。

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其特征在于将浓缩的蛋白质溶液稀释 10 倍或更少。

15. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法, 其特征在于将所述的回收的蛋白质微胶粒团干燥成蛋白质粉末。

16. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法, 其特征在于所述上

清液分批地、半连续或连续处理，回收得到额外数量的蛋白质分离物。

17. 如权利要求 16 所述的方法，其特征在于通过如下所述方法从溢出的上清液中回收得到所述的额外数量的蛋白质溶液：

- (a) 将上清液浓缩到蛋白质浓度为 100-400g/L，并且干燥浓缩的上清液得到蛋白分离物，其蛋白质含量至少为 90%重量，以 Kjeldahl 氮 $\times 6.25$ 确定；
- (b) 将上清液浓缩到蛋白质浓度为 100-400g/L，将浓缩的上清液与回收的蛋白质微胶粒团混合，并且干燥混合物得到蛋白分离物，其蛋白质含量至少为 90%重量，以 Kjeldahl 氮 $\times 6.25$ 确定；或
- (c) 将溢出的上清液浓缩到蛋白质浓度为 100-400g/L，将一部分浓缩的上清液与至少一部分回收的蛋白质微胶粒团混合，并干燥所得的混合物得到蛋白分离物，其蛋白质含量至少为 90%重量，以 Kjeldahl 氮 $\times 6.25$ 确定，并且任选地干燥其余的浓缩上清液和其余的回收的蛋白质微胶粒团。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于浓缩所述上清液至蛋白质浓度为 200-300 g/L。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于所述由上清液浓缩得到的蛋白质分离物的蛋白质含量至少为 100%重量。

20. 如权利要求 1-6、10 中任一项所述的方法，其特征在于所述油籽粗粉为卡诺拉油籽粗粉、油菜籽粗粉或芥菜籽粗粉。

21. 如权利要求 1-10 中任一项所述的方法，其特征在于所述蛋白质分离物的蛋白质含量至少为 100%重量，以 Kjeldahl 氮 $\times 6.25$ 确定。

生产油籽蛋白分离物的连续方法

相关申请参考文献

本申请根据 35USC119(e) 要求于 2001 年 11 月 20 日提交的美国临时专利申请 60/331,646 和 2002 年 5 月 30 日提交的美国临时专利申请 60/383,809 的优先权。

发明领域

本发明涉及生产油籽蛋白分离物的改进方法。

发明背景

在美国专利 5,844,086 和 6,005,076 (“Murray II”) 中描述了一种从具有相当脂肪含量的油籽粗粉，包括具有上述含量的卡诺拉 (canola) 油籽粗粉中分离蛋白分离物的方法，上述专利已转让于其受让人，其公开内容在此均引入作为参考。该方法中所涉及的步骤包括溶解油籽粗粉中的蛋白质类物质以及粗粉中的脂肪，并从所得蛋白质水溶液中除去脂肪。在除去脂肪步骤之前或之后，可将蛋白质水溶液与残留的油籽粗粉分离。在保持离子强度基本恒定的同时，浓缩脱脂的蛋白质溶液以增加蛋白浓度，随后可对浓缩的蛋白质溶液进行再一次的除脂步骤。然后稀释浓缩的蛋白质溶液以形成高度聚集的蛋白分子的云状团例如微胶粒形式的分立的蛋白质液滴。让蛋白质微胶粒沉降形成聚集、凝聚而稠密的无定形粘胶质面筋样蛋白分离物，被称为“蛋白质微胶粒团”或 PMM，并将它从残留水相中分离和干燥。

蛋白分离物在干重下的蛋白质含量 (根据 Kjeldahl N $\times$ 6.25 测定) 至少约为 90 重量%，基本上未变性 (根据差示扫描量热法测定) 并且含有低含量的残余脂肪。本文中使用的术语“蛋白质含量”是指在干重下的蛋白分离物中的蛋白质数量。根据从油籽粗粉中提取并以干燥蛋白分离物形式回收的蛋白质比例，测得利用该方法获得的蛋白分离物的产率通常低于 40 重量%，一般约在 20 重量%左右。

如在 USP 4,208,323 (Murray IB) 中描述了根据上述专利中所述方法开发出了一种从各种蛋白质原料，包括油籽中生产蛋白分离物的改进方法。在 1980 年 USP 4,208,323 公布时获得的油籽粗粉的脂肪污染水平不及卡诺拉油籽粗粉，因而按照 Murray II 工艺，美国专利

4,208,323 的方法不能从现在的油籽粗粉中生产出蛋白质含量高于 90 % 的蛋白质类物质。在 USP 4,208,323 中没有记载用油菜籽(卡诺拉)粗粉作为起始原料的任何具体的试验。

USP 4,208,323 本身是设计为美国专利 4,169,090 和 4,285,862 (Murray IA) 所述方法的改进方法,它在稀释形成 PMM 前引入了浓缩步骤。较后的步骤用于把 Murray IA 方法的蛋白分离物的产率提高 20 重量%左右。

在 2001 年 5 月 4 日提交的共同未决的美国专利申请 60/288,415, 2001 年 10 月 5 日提交的 60/326,987, 2001 年 11 月 7 日提交的 60/331,066, 2001 年 11 月 26 日提交的 60/333,494, 2002 年 4 月 24 日提交的 60/374,801 以及 2002 年 5 月 3 日提交的 10/133,391 中描述了对应用于油籽的蛋白分离物生产现有技术的进一步改进,以提高干燥蛋白分离物产品的产率,它是根据从油籽粗粉中提取并以蛋白分离物形式回收的蛋白质比例测得,并获得高纯度的蛋白分离物,以 $N \times 6.25$ 的 Kjeldahl 氮(N)转换率计,通常为至少约 100%重量,上述专利已转让于其受让人,公开内容在此均引入作为参考。本文中使用的蛋白质含量是在干重下测定的。该方法特别适用于生产卡诺拉蛋白分离物。

在上述美国专利申请 60/288,415、60/326,987、60/331,066、60/333,494、60/374,801 和 10/137,391 描述的方法中,用食品级盐的水溶液浸提油籽粗粉。如果需要,在用色素吸附剂初步处理后,将所得蛋白质浸取液用超滤膜缩小体积以提供蛋白质含量超过约 200g/L 的浓缩蛋白质溶液。然后将浓缩的蛋白质溶液稀释于冷却水中,形成能被分离的白云状蛋白质微胶粒。在除去上清液后,干燥沉淀的粘胶质团块(PMM)。

在上述方法中的以及如申请 60/326,987、60/331,066、60/333,494、60/374,801 和 10/137,391 所具体描述的一个实施方案中,处理来自 PMM 沉降步骤的上清液,以从湿 PMM 和上清液中除去含有干燥蛋白的蛋白分离物。该工艺是通过最初用超滤膜浓缩上清液,然后将浓缩的上清液与湿 PMM 混合并干燥混合物完成的。所得卡诺拉蛋白分离物具有至少约 90%重量蛋白质,优选至少约 100%重量蛋白质($N \times 6.25$)的高纯度。

在上述方法中的以及如申请 60/331,066、60/333,494、60/374,801 和 10/137,391 所具体描述的另一个实施方案中,处理来自 PMM 沉降步骤的上清液,以回收上清液中的蛋白质。该工艺是通过最初用超滤膜浓缩上清液并干燥浓缩物完成的。所得卡诺拉蛋白分离物具有至少约 90% 重量蛋白质优选至少约 100% 重量蛋白质 ($N \times 6.25$) 的高纯度。

在 2001 年 12 月 13 日提交的共同未决的美国专利申请 60/339,350 和 2002 年 6 月 25 日提交的 60/391,046 中描述了一种能提高从卡诺拉油籽粗粉中获得高蛋白含量的方法,它是通过采用在约 100℃ 或更低的温度下脱溶剂的粗粉而实现的,上述专利已转让于其受让人,公开内容在此均引入作为参考。该粗粉可用作本发明方法的起始原料。

在共同未决的美国专利申请 2002 年 8 月 8 日提交的 60/401,782 中描述了从经溶剂浸提卡诺拉油籽除去残留量的油后所得的粗粉残渣中回收卡诺拉蛋白分离物的方法,该粗粉残渣通常被称为“白色片状”或较少被称为“榨渣”粗粉,上述专利已转让于其受让人,公开内容在此均引入作为参考。上述粗粉可用作本发明方法的起始原料。

发明概述

已经发现如果以连续的方式生产油籽蛋白分离物能产生显著的优势。如果浸取步骤以连续的方式进行,而非按上述专利和专利申请所述的分批进行,那么可显著缩短浸取相同或更高蛋白水平时初始蛋白质浸取步骤所需的时间,以及可以在较高温度下进行浸取步骤。此外,在连续操作的过程中污染的机会较少,从而产品的纯度较高并且该方法可在更为紧凑的设备中进行。

本文中公开的连续操作可在 Murray I 和 Murray II 专利中所述的浓缩和稀释条件下进行,但为了获得所述益处,本文所述连续操作优选在上述美国专利申请 60/288,415、60/326,987、60/331,066、60/333,494、60/374,801 和 10/137,391 所述的浓缩和稀释条件下进行。

根据本发明,在此提供了一种制备蛋白分离物的方法,其包括(a)在至少约 5℃ 的温度下连续浸提油籽粗粉,以使油籽粗粉中的蛋白溶解并形成 pH 约为 5-6.8 的蛋白质水溶液,(b)连续地将蛋白质水溶液与油籽粗粉残渣分离,(c)通过选择性膜操作连续地输送蛋白质水溶

液以使在保持离子强度基本恒定的同时，将蛋白质水溶液中的蛋白质浓度增加到至少约 50g/L，从而得到浓缩蛋白质溶液，(d)将浓缩蛋白质溶液与低于约 15℃的冷水连续混合，以使在水相中产生蛋白质微胶粒，(e)所得混合物连续地流入沉降器中，同时让上清液溢出该沉降器，(f)让蛋白质微胶粒在沉降器中连续沉降，同时上清液连续地从沉降器中溢出，直至在沉降器中积累得到所需量的无定形的、粘结的、胶质的、面筋样的蛋白质微胶粒团，并且(g)从沉降器中回收蛋白质微胶粒团，该蛋白质微胶粒团的蛋白质含量至少约为 90%重量，优选至少约为 100%重量，以 Kjeldahl 氮 $\times 6.25$ 测定。

蛋白质微胶粒团形式的蛋白分离物产品在本文中被描述为“面筋样”。该描述是指蛋白分离物的外观和手感与那些活性小麦面筋相似而不是指其化学特性与面筋相同。

在该方法的一个实施方案中，沉降步骤所得的上清液被分批地、半连续地或连续地浓缩，并且所得的浓缩上清液经干燥得到干重下蛋白质含量至少为约 90%重量 ($N \times 6.25$) 的蛋白分离物。

在该方法的另一个实施方案中，沉降步骤所得的上清液被分批地、半连续地或连续地浓缩，将所得浓缩上清液与蛋白质微胶粒团混合，然后干燥，并且将所得混合物干燥，得到干重下蛋白质含量至少为约 90%重量 ($N \times 6.25$) 的蛋白分离物。

在本发明的另一个实施方案中，将终步骤所得的上清液分批地、半连续地或连续地浓缩，仅把一部分的所得浓缩上清液与至少一部分蛋白质微胶粒团混合，然后干燥，以得到本发明的其它新颖的蛋白分离物，该蛋白分离物的蛋白质含量在干重下至少为约 90%重量 ($N \times 6.25$)。

根据本方法生产的蛋白分离物可用于蛋白分离物的常规应用，比如加工食品的蛋白质营养强化、油的乳化、焙烤食品的成形和夹带气体的产品中的起泡剂。此外，蛋白分离物可形成蛋白质纤维用于肉类似物，可用作蛋白替代物或作为将蛋白用作粘合剂的食物中的补充剂。卡诺拉蛋白分离物可用作营养增补剂。卡诺拉蛋白分离物还可用于宠物食物、动物饲料、工业和化妆品应用，以及个人护理用品。

附图简介

图 1 是根据本发明的一个实施方案的生产油籽蛋白分离物的连续

工艺的示意图。

发明详述

本发明方法的起始步骤包括从油籽粗粉，尤其是卡诺拉粗粉中溶出蛋白质类物质，尽管该方法可用于其它油籽粗粉，比如大豆、传统的油菜籽、传统的亚麻、林诺拉 (linola)、向日葵和芥子油籽粗粉。本发明更特别针对卡诺拉油籽粗粉作了描述，该粗粉可以是低温脱溶剂粗粉。

从卡诺拉油籽粗粉中回收的蛋白质类物质可以是天然存在于卡诺拉油籽或其它油籽中的蛋白质，或者该蛋白质类物质可以是经基因操作改性的但是具有天然蛋白质的典型疏水性和极性特性的蛋白质。卡诺拉粗粉可以是任何从卡诺拉籽中脱去卡诺拉油后得到的含有不同量的未变性蛋白质的卡诺拉粗粉，例如经过了热己烷浸提或冷油挤压法而得到的。卡诺拉油籽也被称为油菜籽或油籽油菜。

蛋白质的溶出使用了盐溶液，并且常用盐是氯化钠，虽然可使用适于蛋白质提取的其它盐类，比如氯化钾。盐溶液的离子强度至少约为 0.10，优选至少约为 0.15，如此可以有效地溶出相当数量的蛋白质。随着盐溶液的离子强度逐渐增加，从蛋白质原料中溶出的蛋白质最初也一起增多直至达到最高值。接下来，无论怎样增高离子强度，将不再增加溶出蛋白质的量。使溶出蛋白质的量达到最大值时所需要的食品级盐溶液的离子强度，取决于所选用的盐的种类和蛋白质原料的类别。

考虑到随着离子强度的增高，在使蛋白质沉淀下来的过程中需要更大的稀释度，所以一般优选离子强度低于约 0.8，更优选约为 0.15-0.6。

盐溶解步骤进行迅速，一般至多在约 10 分钟，优选溶解步骤从原料中基本上浸提出尽可能多的蛋白质，从而得到整体高产率。溶解优选在较高温度下进行，优选高于约 35℃，一般最高达到约 65℃。

盐水溶液和油籽粗粉的天然 pH 为约 5-6.8，由此可以通过微胶团途径得到蛋白分离物，这些将在后文中详细介绍。获取最大产量的蛋白分离物所需的最适 pH 值取决于所采用的蛋白质原料。

当处于或者接近 pH 范围的极限时，通过微胶团途径只能部分地生成蛋白分离物，较之取值范围内的其它 pH，其可以达到的产率要低。

因此, 优选的 pH 值是约 5.3-6.2。

在浸提步骤中, 可使用任何合适的酸, 通常为盐酸, 或碱, 通常为氢氧化钠, 将盐溶液的 pH 调节到约 5-6.8 范围内的任何想要的值。

在溶解步骤中, 盐溶液中的蛋白质原料的浓度可以在较大范围内变化。一般其浓度范围在约 5-15% w/v (重量/体积)。

使用盐水溶液浸提蛋白质的步骤还有溶出存在于卡诺拉粗粉中的某些脂肪的附带作用, 这将导致水相中出现脂肪。

来自浸提步骤的蛋白质溶液的蛋白质浓度一般为约 5-40g/L, 优选为约 10-30g/L。

从油籽粗粉中浸提蛋白质可按照能从油籽粗粉中连续浸提蛋白质的任何便利方式进行, 比如将油籽粗粉和食品级盐溶液的混合物以一定的流速经一定的驻留时间流过具有某一长度的导管, 以使足以进行符合上述参数的所需的浸提。

可替代地, 浸提工序可以在搅拌罐中进行, 把油籽粗粉和盐溶液的混合物连续地加入其中, 并且把蛋白质水溶液连续地从中除去。此外, 该工序可以以与连续方式等效的半连续方式进行, 其中将油籽粗粉盐溶液的混合物加入第一个搅拌容器, 在该容器内进行浸提形成蛋白质水溶液, 同时来自第二个搅拌容器的蛋白质水溶液连续地加入到下述粗粉残渣的分离步骤中。当蛋白质水溶液已在第一个容器中形成并且第二个容器中的蛋白质水溶液已经排空时, 则第一个容器随之成为第二个容器, 反之亦然。

由浸提步骤得到的水相随后以任何便利的方式从卡诺拉粗粉残渣中分离, 比如通过利用真空过滤, 随后经离心和/或过滤除去粗粉残渣。可以将分离出来的粗粉残渣干燥后用于处理。

通过将活性炭粉末或其它色素吸附剂与分离所得的蛋白质水溶液混合并随后便利地通过过滤除去这些吸附剂, 得到蛋白质溶液, 使最终蛋白分离物的颜色在浅色和较少黄色方面有所改进。对分离所得的蛋白质水溶液进行渗滤也可用于除去色素。

上述色素去除步骤可以在任何方便的条件下进行, 一般在分离所得的蛋白质水溶液的环境温度下使用任何适宜的色素吸附剂。就活性炭粉末而言, 其用量为约 0.025-5w/v, 优选为约 0.05-2w/v。

如 USP5,844,006 和 6,005,076 (上述专利已转让于其受让人, 其

公开内容在此均引入作为参考)中所述,当卡诺拉油籽粗粉含有相当量的脂肪时,则可针对分离所得的蛋白质水溶液和浓缩的蛋白质水溶液进行所述的脱脂步骤。当要进行颜色改进步骤时,该步骤可在第一次脱脂步骤后进行。

作为用盐水溶液浸提油籽粗粉的另一个替代方案是仅用水浸提,虽然仅用水浸提油籽粗粉所得的蛋白质倾向于少于用盐水溶液浸提。当采用该替代方案时,则在除去油籽粗粉残渣后向蛋白质溶液中加入上述浓度的盐,以在浓缩步骤期间维持溶液中的蛋白质。当进行脱色步骤和/或第一次脱脂步骤时,一般在上述操作完成后加入盐。

另一替代方法是用超过约 pH6.8,一般最高达约 pH9.9 的相对高 pH 值的盐溶液浸提油籽粗粉。可使用任何方便的碱,比如氢氧化钠水溶液将盐溶液的 pH 调到碱性值。可替换地,可以用低于约 pH5,一般最低至约 pH3 的相对低 pH 值的盐溶液浸提油籽粗粉。可使用任何合适的酸,比如盐酸将盐溶液的 pH 调到酸性值。当使用这样的替代方法时,随后以任何便利的方式将由浸提油籽粗粉步骤得到的水相从卡诺拉粗粉残渣中分离,比如通过利用真空过滤,随后经离心和/或过滤除去粗粉残渣。分离出来的粗粉残渣可先行干燥后以备处理。

在进行下述其它工序前,将由高或低 pH 浸提步骤所得的蛋白质水溶液的 pH 按照以上所述调节到约 5-6.8,优选约 5.3-6.2 的范围内。可使用任何合适的酸,通常为盐酸,或合适的碱,例如氢氧化钠调节 pH。

而后将蛋白质水溶液浓缩,以增高蛋白质的浓度,同时维持溶液的离子强度基本恒定。进行这样的浓缩,使浓缩的蛋白质溶液的蛋白质浓度至少为约 50g/L。为了获得如上述美国专利申请 60/288,415、60/326,987、60/331,066、60/333,494、60/374,801 和 10/137,391 描述的提高了的蛋白分离物产率,优选进行上述浓缩,使浓缩的蛋白质溶液的蛋白质浓度至少为约 200g/L,更优选至少为约 250g/L。

可以按照符合连续操作的任何合适的方式进行浓缩步骤,比如利用任何方便的选择性膜技术,如使用膜,比如中空纤维膜或螺旋缠绕膜进行超滤,根据不同的膜材料和构造,该膜具有适宜的分子量截止值,如约 3000-50,000 道尔顿的分子量范围,并且将其尺寸限定到蛋白质水溶液通过该膜时能获得所需的蛋白质水溶液的浓缩程度。

浓缩步骤可以在任何合适的温度下，一般为约 20℃-60℃下进行，以在一定时间内达到所需的浓缩程度。所用的温度及其它条件在一定程度上取决于进行浓缩所使用的膜设备和所需的溶液中的蛋白质浓度。

众所周知，超滤和相似的选择性膜技术允许低分子量物质通过而阻止高分子量物质通过。低分子量物质不仅包括食品级盐的各种离子，而且还包括从原料中浸提出来的低分子量物质，比如碳水化合物、色素和抗营养因子，以及任何低分子量形式的蛋白质。通常根据不同的膜材料和构造，来选择膜的分子量截止值，以保证将相当比例的蛋白质保留在溶液中，同时让污染物通过。

当进行浓缩以提供蛋白质含量至少为约 200g/L，优选至少为约 250g/L 的浓缩蛋白质水溶液时，取决于浓缩步骤所用的温度，可以把浓缩蛋白质溶液加热到约 20℃-60℃，优选约 25℃-35℃，以降低浓缩蛋白质溶液的粘度而有利于随后的稀释步骤和微粒形成。浓缩的蛋白质溶液不应被加热到超过使浓缩蛋白质溶液不能通过用冷水稀释形成微粒的温度。

如果需要，可对浓缩蛋白质溶液进行如上述 USPs 5,844,006 和 6,005,076 中所述的进一步脱脂操作。

随后，将经浓缩步骤和任选的脱脂步骤得到的浓缩蛋白质溶液通过与冷水混合而进行稀释，冷水的体积为达到所要的稀释度所需要的体积，以实现微粒形成。根据要通过微粒途径获得的所需蛋白质的比例和要上清液获得的蛋白质的比例的不同，可以改变稀释度。一般，在较高稀释水平下，水相中保留了较高比例的卡诺拉蛋白质。当需要通过微粒途径获得最高比例的蛋白质时，将浓缩蛋白质溶液稀释少于约 15 倍，更优选约 10 倍或更少。

可以通过连续地将浓缩蛋白质溶液输入 T 形管的一个入口，同时稀释水流入 T 形管的另一个入口，使它们在管中混合，而实现稀释操作。稀释水以足以获得所需稀释度的流速流入 T 形管。稀释水的温度低于约 15℃，一般约为 3℃-15℃，优选低于约 10℃，因为在所用的稀释倍数下，在这些较低的温度下可以提高蛋白质微胶粒状的蛋白分离物的产率。

将浓缩的蛋白质溶液和稀释水在管道中混合，引发蛋白质微胶粒

形成, 并且该混合物连续地从 T 形管出口流入沉降器中, 当其充满沉降器时, 上清液从沉降器中溢出。沉降器可以一开始就充满了冷水, 它逐渐被从管道出口流入的混合物所替代。

以能将液体内部的湍流最小化的方式把混合物加入沉降器中的液体中, 从而让微粒合适地沉降。为了实现该目的, 通常让混合物从出口流入位于沉降器液体表面下方的 T 形管。此外, 出口被设计和构造成能使液体沿着沉降器上的水平的径向从管道流出。

让蛋白质微胶粒在沉降器中沉积以形成聚集、凝聚而稠密的无定形的面筋样蛋白质微胶粒团 (PMM), 并且连续进行该方法直至沉降器底部积累到所需量的 PMM, 随之把积累的 PMM 从沉降器中移去。在从沉降器中移去积累的 PMM 前, 可以离心蛋白质微胶粒团, 以减少团块的含水量。离心一般可使蛋白质微胶粒团的含水量从占总微胶粒团的约 70%重量-95%重量降低到约 50%重量-80%重量。以这种方式降低蛋白质微胶粒团的含水量的同时也降低了蛋白质微胶粒团中包藏的盐含量, 从而降低了干燥蛋白分离物的盐含量。可替换地, 沉降步骤可在连续离心下进行。

回收的 PMM 可在湿态或干态下应用, 可以通过任何方便的技术, 例如喷雾干燥, 冷冻干燥或真空鼓干燥, 得到干品。这种干燥的 PMM 具有至少约 90%重量, 通常超过约 100%重量蛋白质(用 Kjeldahl N $\times$ 6.25 计算)的高蛋白质含量, 并且基本上没有变性(根据差示扫描量热法测定)。当应用上述美国专利 5,844,086 和 6,005,026 的方法时, 这种从含脂肪的油籽粗粉里分离得到的干燥 PMM 还含有较低的脂肪残存量, 可以低于约 1%重量。

正如上述美国专利申请 60/331,066、60/333,494、60/374,801 和 10/137,391 中具体描述的, 可以处理来自 PMM 形成步骤的上清液以从中回收其它的蛋白质。该方法可以包括最初的对上清液的浓缩。可利用任何方便的选择性膜技术进行浓缩, 例如使用膜进行超滤, 该膜具有适宜的分子量截止值, 可允许低分子量物质, 包括盐以及从蛋白质原料中浸提出来的其它非蛋白质类的低分子量物质通过该膜, 同时将卡诺拉蛋白质保留在溶液中。根据不同的膜材料和构造, 可使用分子量截止值为约 3000-约 10,000 的超滤膜。虽然如果需要可以采用对收集的溢出上清液进行分批处理的工艺, 但是优选对连续溢出的上

清液连续地进行浓缩。在这样的连续操作中，将膜的大小限定到当上清液通过该膜时能获得所需的上清液浓缩程度。

以这种方式浓缩上清液还降低了回收蛋白分离物所需干燥的液体体积，从而降低了干燥所需的能量。一般在干燥前，将上清液浓缩到蛋白质浓度为约 100-400g/L，优选为约 200-300g/L。

可以通过任何方便的方式，例如喷雾干燥，冷冻干燥或真空鼓干燥，来干燥浓缩的上清液而得到干品，以获得另外的卡诺拉蛋白分离物，其蛋白质含量至少为约 90%重量，优选至少为约 100%重量 ($N \times 6.25$)，并且基本上没有变性（根据差示扫描量热法测定）。

可替换地，正如上述美国专利申请 60/326,987、60/331,066、60/333,494、60/374,801 和 10/137,391 中描述的，可以把浓缩上清液与湿 PMM 混合，并且干燥所得混合物，以获得另外的卡诺拉蛋白分离物，其蛋白质含量至少为约 90%重量，优选至少为约 100%重量 ($N \times 6.25$)，并且基本上没有变性（根据差示扫描量热法测定）。

在另一个替代方法中，把仅仅一部分的浓缩上清液与一部分 PMM 混合，并且干燥所得混合物，可以干燥剩余的浓缩上清液以及任何剩余的 PMM。另外，可以把干燥的 PMM 和干燥的上清液按照上述任何所要的相对比例进行干混。

优选实施方案的描述

参看图 1，它示意性地图示了本发明的一个实施方案的流程图。将卡诺拉油籽粗粉和水性浸提介质分别经管道 10 和 12 加入搅拌器 14，油籽粗粉和浸提介质在其中混合并且将混合物经管道 16 送入混合管 18 中。在混合管 18 中，浸提油籽粗粉并形成蛋白质水溶液。让蛋白质水溶液和油籽粗粉残渣的浆液经管道 20 送入真空过滤带 22，以分离残留的油籽粗粉，该残留物经管道 24 排出。随后将蛋白质水溶液经管道 26 送入澄清操作室 28，将蛋白质水溶液在其中离心和过滤以除去细粉，并通过管道 30 回收细粉。

澄清后的蛋白质水溶液经管道 32 泵送通过超滤膜 34，膜尺寸限定到能获得所需的蛋白质水溶液的浓缩程度，从而产生作为滞留物存在于管道 36 中的浓缩的蛋白质溶液，同时渗透物经管道 38 被回收。浓缩蛋白质溶液被送入混合三通管 40 的入口，同时冷水经管道 42 也送入其中，冷水的体积足以达到所需的稀释度。所得溶液经管道 44

流入沉降罐 46 中以使蛋白质微胶粒团沉降。在沉降罐 46 中沉降的蛋白质微胶粒团不时地经管道 48 除去, 并通过喷雾干燥器 50, 得到干燥的卡诺拉蛋白分离物 52。

经管道 54 将上清液从沉降罐中除去, 并且泵送通过超滤膜 56, 得到作为滞留物存在于管道 58 中的浓缩蛋白质溶液, 同时渗透物经管道 60 被除去。让浓缩的蛋白质溶液通过喷雾干燥器 62, 进一步得到干燥的卡诺拉蛋白分离物 64。

可替换地, 可以让管道 58 中的浓缩蛋白质溶液经管道 66 输送与蛋白质微胶粒团混合, 然后在混合物被喷雾干燥器 50 干燥。

实施例

实施例 1

本实施例详细说明了根据本发明的一个实施方案的生产卡诺拉蛋白分离物的连续方法。

在 50℃ 下, 将 200g 卡诺拉粗粉加入 1350ml (15% w/v) 的 0.15M 氯化钠溶液中。让所得混合物通过一管道, 该管道的长度足以使混合物在管道中的总滞留时间达到 5 分钟。分析从管道中流出的浸取物, 显示蛋白质含量为 20.5g/L。作为对照, 在 24℃ 下, 以分批的方式用盐 (0.15M NaCl) 溶解 15% w/v 的卡诺拉粗粉, 在混合 30 分钟后, 得到蛋白质含量为 18.3g/L (根据 BW-AH014-H29-01A 运作)。

如实施例 2 所述批处理方法制得 8 升蛋白质含量为 296g/L 的浓缩滞留物 (参见 BW-AH014-H29-01A)。在 30℃ 下, 将该浓缩的滞留物以 64ml/分钟的速度泵送入 T 形连接管的一个入口, 并与以能提供 1:10 的稀释率的速度被泵送入 T 形连接管的另一个入口的 4℃ 水混合。T 形连接管是作为混合两股液流的设备, 并且导致白云状的蛋白质微胶粒形成。随后让混合物从 T 形连接管的出口流出进入装满 4℃ 水的 50 升沉降器中, 沉降器中的混合物通过出口流出管道, 其中出口被设计成能使沉降器中的涡流最小化。上清液从沉降器的顶部排出以保持沉降器内的体积恒定。运行该系统耗时 2 小时。

当滞留物/水混合物流入沉降器时, 在微胶粒和上清液之间开始形成边界层。在开始沉降后的 1 个小时内, 沉降器内的边界层向上移动。同时, 在沉降器底部可看到沉淀的粘胶质团 (PMM) 层。随着运

行的进展, PMM 层的体积稳步增长。在沉降中的微胶粒和上清液之间的边界层稳定在大约与滞留物/水混合物出口持平的水平上。从沉降器排出的上清液是澄清的, 并且排出的上清液中看不见微粒。

沉降过程后, 从沉降器底部排出的 PMM 的固形物含量为 29.8%重量, 并且相当于滞留物中的蛋白质的 49%重量。

相比之下, 以成批的方式, 在 30℃下, 将 40 升蛋白质含量为 283g/L 的浓缩滞留物以 1:10 的比例用 4℃自来水稀释, 并且使微胶粒沉降 1 小时。从沉降器底部回收的 PMM 的固形物含量为 36.2%重量, 并且相当于滞留物中蛋白质的 42%重量 (根据 BW-AH014-H29-01A 运作) (参见实施例 2)。

实施例 2

本实施例提供了前述实施例所述的批处理的细节。

在环境温度下, 将 “a” kg 浓缩的卡诺拉粗粉加入 “b” L 的 0.15M NaCl 溶液中, 并且搅拌 “c” 分钟, 以得到蛋白质含量为 “d” g/L 的蛋白质水溶液。在真空过滤带上除去和清洗残留的卡诺拉粗粉。所得蛋白质溶液经离心澄清, 以获得蛋白质含量为 “e” g/L 的澄清的蛋白质水溶液。

将蛋白质提取溶液经超滤系统浓缩, 所用膜的分子量截止值为 3000 道尔顿。所得浓缩的蛋白质溶液的蛋白质含量为 “f” g/L。在 “g” ℃下, 将浓缩的溶液以 1:10 稀释到 4℃的自来水中。立即形成白云状并使其沉降。除去上层稀释水并干燥沉淀出的粘胶质团。该产品被指定为 “h”。

在下表 I 中列出了不同蛋白质产品样品的具体参数 “a” 至 “h”:

表 I

H	a	b	c	d	e	f	g
BW-AH014-H29-01A	1200	8000	30	18.3	14.7	296	(1)
BW-AH014-I05-01A	1200	8000	30	19.0	14.2	283	36.8

(1) 未测得

实施例 3

本实施例详细说明了应用连续方法处理芥子、非 GMO 卡诺拉、高芥子酸油菜籽 (H. E. A. R)、白色片状卡诺拉粗粉和冷压制得的卡诺拉粗粉的连续浸提阶段。

将油籽粗粉加入 55℃ 的被分成 500ml 等份的 0.15M NaCl 溶液中，以提供具有下述浓度的混合物：

- 芥子、高芥子酸油菜籽和非 GMO 卡诺拉：15%w/v

- 白色片状及冷压制得的卡诺拉粗粉：10%w/v

混合物被泵送通过一管道，该管道的长度能允许在管道中进行 5 分钟的浸提。样品一流出管道，就分析其蛋白质含量。

表 II 中列出了所测得的结果：

表 II

油籽粗粉	浸提物的蛋白质含量
芥子	27.3mg/ml
H. E. A. R.	12.0mg/ml
非 GMO 卡诺拉	10.7mg/ml
白色片状物	23.0mg/ml
冷压制得的卡诺拉	21.1mg/ml

实施例 4

本实施例阐明了应用连续方法处理芥子、非 GMO 卡诺拉、高芥子酸油菜籽、白色片状卡诺拉粗粉和冷压制得的卡诺拉粗粉的连续稀释阶段。

在室温下，在 0.15M NaCl 溶液中浸提油籽粗粉，每一种油籽粗粉均混合 30 分钟。白色片状及冷压制得的卡诺拉粗粉的种籽浓度为 10%w/v，并且 H. E. A. R.、非 GMO 卡诺拉粗粉和芥子粗粉的种籽浓度为 15%w/v。在 30 分钟的混合期后，通过 10,000×g 离心 10 分钟从蛋白质浸提液中除去固体物质。随后蛋白质溶液在真空过滤仪器中经 Whatman #4 滤纸过滤澄清。

每一澄清液经 Amicon 小型搅拌室浓缩系统浓缩，该系统使用 MWC0 膜，它足以留住可溶性蛋白质，同时允许水和小分子量污染物渗过。每一蛋白质溶液被浓缩到 200mg/ml 或更高。

浓缩后，利用两个蠕动泵和一个 t 形连接管以连续的方式稀释滞留物。将泵速调节到使第一个泵输液的流速比第一个泵快 10 倍，从而获得滞留物与水的稀释率为 1:10。同时启动两个泵，并且将滞留物和水通过 t 形连接管泵送入共用管道，滞留物和水在 t 形连接管中混合并且开始形成微粒。

所得溶液随后被送入沉降罐中，让沉淀在此沉降。收集沉降的 PMM 颗粒并冻干，计算形成的每一 PMM 的产率和蛋白质含量。在下表 III 和 IV 中列出了从每种种籽获得的结果：

表 III

浸提物

油籽粗粉	蛋白质含量	浸提体积	蛋白质量
H. E. A. R.	11.7mg/ml	800ml	9.36g
芥子	31.6mg/ml	600ml	19.0g
非 GMO 卡诺拉	6.9mg/ml	1000ml	6.9g
白色片状卡诺拉	18.0mg/ml	900ml	16.2g
冷压制得的卡诺拉	16.4mg/ml	1000ml	16.4g

表 IV

PMM

油籽粗粉	重量	蛋白质含量 ⁽¹⁾	产率 ⁽²⁾
H. E. A. R.	3.71g	107 重量 %	40 重量 %
芥子	8.54g	101 重量 %	45 重量 %
非 GMO 卡诺拉	2.92g	103 重量 %	42 重量 %
白色片状卡诺拉	7.1g	105 重量 %	44 重量 %
冷压制得的卡诺拉	6.94g	100 重量 %	42 重量 %

注意：

- (1) 蛋白质含量是根据 Kjeldahl N×6.25 测定的。所有形成的 PMM 产品均是蛋白分离物。
- (2) 测定的产率是根据以 PMM 形式回收的浸提蛋白质的比例。

公开总结

总结本公开文本，本发明提供了一种生产油籽蛋白分离物的连续方法。在本发明的范围内可进行各种改进。

