



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

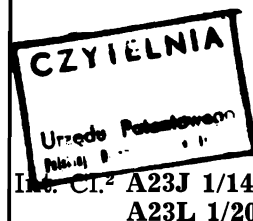
Zgłoszono: 19.06.75 (P. 181389)

Pierwszeństwo: 20.06.74 Szwecja

Zgłoszenie ogłoszono: 22.05.76

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

MKP A23j 1/14
A23l 1/20



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Lars Ingemar Gillberg, Erik Bertil Törnell, Lund
(Szwecja)

**Sposób wyodrębniania produktów proteinowych o małej zawartości
kwasu fitynowego albo jego związków z nasion Brassica i Crambe**

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wyodrębniania produktów proteinowych, nie zawierających albo o małej zawartości kwasu fitynowego albo jego związków, z nasion Brassica albo Crambe.

Kwas fitynowy w związku z tym oznacza umownie związek kwasu inozyto sześcioposforowego, jego sole albo inne jego związki. Wyodrębniony produkt jest zatem praktycznie wolny od glikozynolanów, które są obecne w materiale z nasion, i które mogą reagować z utworzeniem produktów o działaniu wywołującym wole. Wyodrębniony produkt proteinowy wytworzony według opisanej metody jest głównie przewidziany do stosowania w produkcji żywności.

Poszczególne gatunki Brassica rosną jako rośliny oleiste w wielu rejonach świata. W Szwecji i w Polsce jako rośliny oleiste przeważają rzepak i rzepa olejna (Brassica napus i Brassica campestris). Kanada jest największym producentem rzepy olejnej. Również modrak abisyński (Crambe abyssinica) rośnie między innymi w Stanach Zjednoczonych Ameryki, jako roślina oleista. W Indii i Pakistanie, znaczne ilości gorczycy modrej (Brassica juncea) rosną obok rzepaku i rzepy olejnej, a także mniejsze ilości gorczycy jasnej i czarnej (Brassica hirta albo Sinapis alba i Brassica nigra).

Nasiona tych roślin zawierają oprócz oleju dużą ilość proteiny, która z punktu widzenia odżywczego ma bardzo dobrze zrównoważony skład aminokwasów. Z powodu ich wysokiej zawartości pro-

2

tein i odpowiedniego składu aminokwasów proteiny, nasiona te są atrakcyjne jako surowiec do wytwarzania odżywczych produktów proteinowych. Takie produkty mogą być każdy innego rodzaju. Jednym z ważniejszych jest wyodrębniona proteina.

Sposoby wytwarzania wyodrębnionych produktów proteinowych z odtłuszczonej soi i niektórych innych nasion oleistych są już znane. W tych przypadkach odtłuszczone nasiona dysperguje się zwykle w wodnym roztworze alkalicznym, który rozpuszcza większą część proteiny. Po oddzieleniu nierozpuszczonej pozostałości wytrąca się proteinę przez dodanie kwasu. Otrzymany osad stanowi wyodrębniony produkt proteinowy. Ma on większą zawartość proteiny i niższą zawartość włókna niż produkty wytworzone przez mniej lub bardziej selektywne ługowanie nieproteinowych składników nasion.

Badania wykazały, że te znane procesy nie mogą być stosowane do wytwarzania wyodrębnionych produktów proteinowych o dobrych właściwościach funkcjonalnych z nasion gatunków Brassica i Crambe. Wytwarzanie wyodrębnionych produktów proteinowych z tych gatunków z dużą wydajnością i dobrymi właściwościami funkcjonalnymi możliwe jest tylko wówczas, jeśli przeprowadza się różne stopnie procesu wyodrębniania w określonych, starannie kontrolowanych warunkach. Polega to na tym, że zależność między stosowanymi warunkami procesu i wydajnością produktu, i funkcjonalne

właściwości produktu są określone zarówno przez morfologię nasion i skład ich protein, jak również obecność innych niepożądanych składników w nasionach.

Nasiona gatunków Brassica i Crambe różnią się pod tym względem od innych nasion oleistych. Wiadomo zatem, że gatunki Brassica i Crambe zawierają stosunkowo duże ilości (3—4%) glikozynolanów. Glikozynolany są substancjami rozpuszczalnymi w wodzie, które pod wpływem enzymów obecnych w nasionach hydrolizują dając substancje tożsamościowo rozpuszczalne w wodzie jak również nierozpuszczalne w wodzie, mające między innymi efekt wywołujący wole. Te ostatnie związki mogą reagować z proteiną albo mogą być rozpuszczone w oleju, gdzie działają jako trucizna dla katalizatorów stosowanych w procesie uwodornienia. Procesy wytwarzania wyodrębnionych produktów proteinowych z nasion rzepaku muszą być dlatego opracowane w taki sposób, aby zawartość glikozynolanów i produktów ich rozkładu była możliwie jak najmniejsza.

Prosty technicznie i mało kosztowny sposób zapobiegania rozpadowi glikozynolanów stanowi dezaktywowanie enzymów rozszczepiających glikozynolany przez obróbkę cieplną. W celu zmniejszenia ryzyka enzymatycznego rozkładu glikozynolanów w nasionach podczas roztwarzania protein materiał nasion można stosować dlatego po obróbce cieplnej w znany sposób, do wytwarzania wyodrębnionych produktów proteinowych. Obróbka cieplna może prowadzić do znacznego zmniejszenia rozpuszczalności protein z nasion. Jednakże doświadczenia wykazały, że możliwe jest dobranie warunków obróbki cieplnej w taki sposób, że enzymy hydrolizujące glikozynolany zostają całkowicie zdezaktywowane, podczas gdy jednocześnie zostaje zachowana bardzo dobra rozpuszczalność protein w alkalicznym zakresie pH.

Ponadto nasiona gatunku Brassica i Crambe zawierają duże ilości kwasu fitynowego. Zawartość kwasu fitynowego zmienia się zależnie od gatunku nasion, zawartości nawozu mineralnego w glebie i dojrzałości nasion w czasie zbiorów. W odtłuszczonych nasionach Brassica stwierdzono zawartość kwasu fitynowego 2,2—3,9%. Dla odtłuszczonej soi stwierdzono zawartość kwasu fitynowego 1,7% i dla orzecha ziemnego zawartość 1,0%.

Wiadomo, że kwas fitynowy tworzy silne kompleksy z proteiną tak jak z wieloma innymi substancjami. Kompleksy te są często trudno rozpuszczalne w szerokim zakresie pH. Jednakże produkty proteinowe, o dużej zawartości kwasu fitynowego, mają zupełnie odmienne właściwości niż produkty o podobnym składzie lecz o małej zawartości kwasu fitynowego.

Obecność kwasu fitynowego w produktach proteinowych nie tylko wpływa na funkcjonalne właściwości produktu, np. jego rozpuszczalność i zdolność wiązania wody, lecz również na ich wartość powodującą wole. Kwas fitynowy może wywołać ten fakt albo przez tworzenie kompleksów z proteiną, hamując w ten sposób enzymatyczne trawienie proteiny (Barrè, R., Ann. pharm. franc. 14(1956/182), albo przez reakcję z wapniem, magne-

zem, miedzią, cynkiem i żelazem w żywności i w ten sposób zahamowanie adsorpcji tych ważnych składników.

Układ jelitowy człowieka nie zawiera enzymów zdolnych do hydrolizowania kwasu fitynowego. Przy wartościach pH występujących w jelitach kwas fitynowy tworzy trudno rozpuszczalne kompleksy z wyżej wymienionymi jonami metali. Wiadomo, że może to powodować niedobór mineralny przy spożywaniu pokarmów, bogatych w kwas fitynowy. Spożywanie takich pokarmów zwiększa zatem ryzyko niedoboru żelaza. Krzywica może być wywołana przez niedobór wapnia w pożywieniu i stwierdzono, że spożycie pokarmu bogatego w kwas fitynowy wywołuje ujemny bilans wapnia (Reinhold, J.G., et al., The Lancet (1973) str. 283). Spożywanie takiego pokarmu może mieć zatem efekt krzywiczny.

W nasionach Brassica i Crambe kwas fitynowy jest jednakże ulokowany głównie w częściach wewnętrznych. Szczegółowe badania tych nasion wykazały, że główna część związków fosforu jest ulokowana w cząstkach kulistych, które są rozmieszczone w bogatych w proteinę ziarnach aleuronu (von Hofsten, A., Physiologia Plantarum 29 (1), (1973) 76). Zaobserwowano również u ludzi, że dieta bogata w kwas fitynowy zmniejsza poziom cynku w osoczu i zwiększa zawartość w stolcu (Rheinhold et al., The Lancet, 1973, str. 283).

Stwierdzono również, że spadek zawartości cynku w osoczu u szczurów, wywołany np. niedostatecznym doprowadzaniem w pokarmie, powoduje bardzo wysoką częstotliwość występowania zniekształceń płodu (Hurley, L.S., Am.J.Clin.Nutr.22 (1969) 1332). Dlatego przy wytwarzaniu wyodrębnionych produktów proteinowych z materiałów o dużej zawartości kwasu fitynowego ważne jest z wielu względów zastosowanie warunków procesu dających produkty praktycznie nie zawierające kwasu fitynowego.

Stwierdzono, że z wodnej zawiesiny materiału z nasion, poddanych obróbce cieplnej i odtłuszczonych, przy pH rzędu 10,5 — 12, przez oddzielenie materiału nierozpuszczalnego, i wytrącenie rozpuszczonej proteiny z klarownego roztworu za pomocą kwasu i pomocniczego środka strącającego, możliwe jest uzyskanie wyodrębnionego produktu proteinowego, z dużą wydajnością. Dokładne badania wykazały, że warunki rozpuszczalności kwasu fitynowego i proteiny zmieniają się w bardzo skomplikowany sposób ze zmianą wartości pH.

Na załączonym rysunku fig. 1 ilustruje zmiany rozpuszczalności związków zawierających azot i kwasu fitynowego przy różnych wartościach pH podczas ekstrakcji odtłuszczonej mączki z nasion rzepaku za pomocą wodnych roztworów w temperaturze otoczenia. Badania wykazały, że mączka z nasion rzepy olejnej i modraku mają podobne profile rozpuszczalności. Wyniki wskazują, że nasiona gatunku Brassica różnią się pod tym względem bardzo od np. soi. Przyczynę tego przypuszczalnie wyjaśnia fakt, że nasiona Brassica mają bardzo skomplikowany skład protein i zawierają

stosunkowo duże ilości silnie zasadowych protein typu, nie znalezione w soi.

Z profilu rozpuszczalności azotu widać, że mączka z nasion rzepaku zawiera dwie duże, z punktu widzenia rozpuszczalności, różne frakcje proteiny. Z fig. 1 wynika, że maksimum rozpuszczalności kwasu fitynowego uzyskano przy pH około 4,8. W zakresie pH 4,8—8,3 rozpuszczalność kwasu fitynowego maleje, przypuszczalnie w wyniku tworzenia trudno rozpuszczalnych kompleksów z jonami wielowartościowego metalu, obecnymi w nasionach. Potwierdza to obserwacja, że osady po odwirowaniu zawieszin mączki, mające pH rzędu 7—11, zawierają pasma białego osadu, które składają się głównie z fitynianów metali. Przy wartości pH około 8,3 rozpuszczalności kwasu fitynowego i azotu wykazuje minimum. W obrębie pH 8,3 do około 10 rozpuszczalność obydwóch, azotu i kwasu fitynowego wzrasta ze wzrostem wartości pH. Również fityniany wapnia/magnezu mają małą rozpuszczalność w tym zakresie pH, wyniki sugerują, że kwas fitynowy w tym zakresie tworzy silne kompleksy z proteiną.

Rozpuszczalność kwasu fitynowego osiąga maksimum przy wartości pH bliskiej 10. To maksimum występuje w zakresie pH, gdzie liczba dodatnio naładowanych reszt aminokwasu maleje gwałtownie ze wzrostem wartości pH. Duży odsetek zasadowych aminokwasów w nasionach rzepaku stanowią reszty lizyny, których grupa ε-aminowa ma wartość pK_a 10,5. Spadek rozpuszczalności kwasu fitynowego w zakresie pH 10—11 można w ten sposób wyjaśnić dysocjacją kompleksów proteiny i kwasu fitynowego, po czym kwas fitynowy tworzy trudnorozpuszczalne kompleksy soli metali. Wzrost rozpuszczalności kwasu fitynowego przy wartościach pH większych niż 11,5 można wyjaśnić zwiększoną rozpuszczalnością fitynianów metali.

Kwas fitynowy obecny w ekstrakcie proteinowym zostanie związany z proteiną, gdy wytrącony jest wydzielony produkt proteinowy. Oznacza to, że wyodrębniony produkt proteinowy o wysokiej zawartości kwasu fitynowego otrzyma się z ekstraktu proteinowego o wysokiej zawartości kwasu fitynowego i że wydzielony produkt proteinowy o małej zawartości kwasu fitynowego musi być wytwarzany z ekstraktów proteinowych o małej zawartości kwasu fitynowego.

Zaznaczona zależność rozpuszczalności kwasu fitynowego (fig. 1) wskazuje, że wybór warunków ekstrakcji jest skrajnie ważny dla zawartości kwasu fitynowego w otrzymanym wydzielonym produkcie proteinowym. Ilustruje to następujący przykład. Wyodrębniony produkt wytworzono przez ekstrakcję nie poddanej obróbce cieplnej mączki z nasion rzepaku przy pH 11,1. Po oddzieleniu nierozpuszczalnych substancji wytrącono produkt proteinowy przez dodanie rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego i nastawienie pH na 6,6.

Wytrącony produkt proteinowy nie zawierał wykrywalnych ilości kwasu fitynowego. Inny wydzielony produkt proteinowy wytworzono przez wyekstrahowanie mączki z nasion rzepaku z tej samej partii przy pH 10,2. Po oddzieleniu nierozpuszczonych substancji wytrącono produkt proteinowy

przez dodanie rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego do uzyskania pH 8,4. Wyszuszony produkt w tym przypadku zawierał 11,5% kwasu fitynowego, w przeliczeniu na kwas inozyto-sześciofosforowy.

Z fig. 1 wynika, że rozpuszczalność kwasu fitynowego ma minima przy wartościach pH równych 8 i 11. Jedną z możliwości wytwarzania ekstraktu proteinowego prawie nie zawierającego kwasu fitynowego stanowi ekstrahowanie mączki z nasion rzepaku przy pH równym 8. Część kwasu fitynowego w mączce zostaje w ten sposób rozpuszczona. Lecz przy tym pH znaleziono możliwość zlikwidowania rozpuszczalności kwasu fitynowego bez zmniejszenia rozpuszczalności proteiny, przez przeprowadzenie ekstrakcji proteiny w obecności soli wielowartościowych metali.

Procesy oparte na ekstrakcji protein przy pH około 8 są jednak technicznie mniej interesujące niż procesy, w których proteina jest ekstrahowana przy wartościach równych 11. Zależy to od faktu, że wzrost mikrobiologiczny jest znacznie trudniejszy do uniknięcia przy pH 8, niż przy wartości pH równej 11. Z wielu propozycji wytwarzania wyodrębnionych produktów proteinowych z odtłuszczonych nasion Brassica i Crambe jest zatem korzystne przeprowadzenie rozpuszczania proteiny przy wartości pH około 11.

Sposób według wynalazku polega na tym, że proteiny w odtłuszczonych nasionach Brassica i Crambe ekstrahuje się w temperaturze 0—70°C za pomocą wodnego roztworu alkalicznego o wartości pH około 11, gdzie rozpuszczalność kwasu fitynowego z mączki ma minimum.

Stosunek między ilościami odtłuszczonych nasion a cieczą w stopniu ekstrakcji nie jest krytyczny. Można zatem stosować proporcję mączki: cieczy 1:5 albo mniej. W celu ułatwienia ekstrakcji proteiny wskazane jest dodatkowe mielenie odtłuszczonego materiału nasion. Można stosować krótsze czasy ekstrakcji, jeśli materiał nasion jest zmielony. Odtłuszczony materiał nasion dysperguje się w wodzie i dodaje się środek alkaliczny aż do osiągnięciażądanego pH. W celu uzyskania dobrej rozpuszczalności proteiny istotne jest to, aby zawiesina mączki nie była utrzymywana zbyt długo przy kwaśnych lub obojętnych wartościach pH.

Gdy zostanie osiągnięte żądane pH, należy je utrzymać niezmiennie w zakresie około 11, gdzie rozpuszczalność kwasu fitynowego jest mała. Alternatywnie odtłuszczony materiał nasion można zdyspergować bezpośrednio w zasadowym roztworze wodnym, po czym nastawia się pH przez dalsze dodawanie środka alkalicznego. Wadą tego ostatniego sposobu postępowania jest to, że cząstki nasion mają tendencję, w tych warunkach, do skupiania się i tworzenia grudek otoczonych warstwą żelowaną, która powstrzymuje rozpuszczalność proteiny.

W celu podwyższenia pH można np. stosować wodorotlenek sodu, amoniak albo ortofosforany sodu. Jeśli materiał nasion zawiera tylko niewielkie ilości dwu- i trójwartościowych jonów metalu, korzystne jest dodanie małych ilości soli wapnia albo magnezu w celu zapewnienia niskiej zawar-

tości kwasu fitynowego w ekstrakcie proteinowym. Przez dodanie siarczynu albo askorbinianów do ekstrakcji proteiny możliwe jest uzyskanie wyodrębnionego produktu o nieco jaśniejszej barwie niż produktów otrzymanych w nieobecności substancji redukujących.

Temperaturę reakcji utrzymuje się możliwie jak najniższą, aby uniknąć hydrolizy proteiny i innych reakcji ubocznych, które mogą zmniejszyć wartość odżywczą produktu. Jednakże jeśli nasiona zostały poddane surowej obróbce cieplnej, może być potrzebne prowadzenie procesu w podwyższonej temperaturze ze względu na wydajność. Z odżywczego punktu widzenia można stosować czasy ekstrakcji do 24 godzin w temperaturze otoczenia bez obniżenia wartości odżywczej proteiny. W celu zoptymalizowania warunków ekstrakcji ważny jest wybór temperatury, ponieważ jeśli ekstrakcję proteiny przeprowadza się w wyższej temperaturze, to wymagana jest większa ilość alkaliów w celu uzyskania potrzebnego pH dla żądanej rozpuszczalności.

Jeśli temperatura ekstrakcji wzrasta od 20 do 60°C, zużycie alkaliów wzrasta o mnożnik około 10. Wpływa to również na realizację stopnia wytrącania, ponieważ wzrasta ilość kwasu potrzebnego do osiągnięcia pH potrzebnego do wytrącania, i z tego powodu wzrasta moc jonowa ługu macierzystego. Wzrośnie również ilość potrzebnego strącającego środka pomocniczego.

Po zakończeniu rozpuszczania proteiny trzeba oddzielić nierozpuszczony materiał. Przeprowadza się to korzystnie przez odwirowanie, lecz można również zastosować sączenie. Stwierdzono, że część kwasu fitynowego w zawiesinie alkalicznej występuje w postaci bardzo drobnego osadu. Dla uzyskania produktu nie zawierającego kwasu fitynowego istotne jest zatem przeprowadzenie skutecznego stopnia odwirowania albo sączenia. Jeśli stosuje się wielostopniowe odwirowanie albo odrębne sączenie, to można uzyskać łatwo całkowite oddzielenie kwasu fitynowego.

Można również zasadniczo ułatwić oddzielanie kwasu fitynowego przez zaszczepienie zawiesiny. Pozostałość otrzymana w procesie separacji zawiera rozpuszczoną proteinę, którą można odzyskać w jednym lub kilku stopniach przemycania. Stała pozostałość zostaje przy tym zdyspergowana w roztworze wodnym o takim samym pH, jakie stosuje się podczas ekstrakcji, po czym oddziela się nierozpuszczone substancje. Alternatywnie można przeprowadzić ekstrakcję proteiny metodą ekstrakcji przeciwprądowej.

Po oddzieleniu nierozpuszczonej pozostałości wytrąca się proteiny z ekstraktu proteinowego w jednym albo dwóch stopniach. Procesy te przedstawia fig. 2.

W procesie wytrącania dwustopniowego (alternatywa 1 na fig. 2) część rozpuszczonej proteiny zostaje wytrącona w pierwszym stopniu przez dodanie kwasu. Wybór kwasu nie jest krytyczny, lecz pewne kwasy mogą dać specjalne efekty. Zatem wytrącanie za pomocą kwasu siarkawego albo gazowego dwutlenku siarki daje produkt o nieco jaśniejszej barwie niż wytrącanie za pomocą

kwasów nie-redukujących. Fig. 3 pokazuje wydajność wyodrębnionego produktu obliczoną jako stosunek między ilością azotu w wyodrębnionym produkcie i ilością azotu w roztworze ekstraktu. Zawartość proteiny w wyodrębnionym produkcie ($N \times 6,25$), i zawartość suchej substancji w wytrąconym osadzie zmienia się z wartością pH w czasie wytrącania w pierwszym stopniu wytrącania.

Wyniki uzyskano w doświadczeniach z mączką z odtłuszczonych, poddanych obróbce cieplnej nasion rzepaku ekstrahowanych przy pH 11. Z fig. 3 widać, że ilość wytrąconej proteiny jest stosunkowo niezależna od zastosowanego pH przy wytrącaniu. Zakres technicznie interesujący stanowi pH rzędu 3,5—8,5. Jednakże wskazane jest na ogół stosowanie w pierwszym stopniu pH przy wytrącaniu o wartości wyższej niż pH przy wytrącaniu w drugim stopniu wytrącania. Szybkość dodawania kwasu wpływa na wielkość i kształt kłaczków. Jeśli kwas dodaje się powoli przy dokładnym mieszaniu, otrzymuje się wytrącony osad w postaci łatwej do wyodrębnienia.

Wytrącony produkt proteinowy wyodrębnia się przez odwirowanie albo odsączenie po czym wyodrębniony produkt poddaje się kilkakrotnie przemycaniu. W celu uniknięcia strat proteiny w stopniach przemycania wodą do przemycania powinna mieć to samo albo nieco niższe pH niż pH podczas wytrącania.

Te proteiny, które nie zostały wytrącone w pierwszym stopniu strącania, odzyskuje się w drugim stopniu wytrącania przez dodanie pomocniczego środka strącającego i czynnika ustalającego wartość pH, tak że osiąga się wartość pH 3,0—6,5. Jako pomocnicze środki strącające można stosować:

a) Polielektrolity kwaśne, np. alginian sodu, kwas pektynowy, karagenian, furcellan, karboksymetylocelulozę, polifosforany, skrobię, albo inne polielektrolity, nadające się do zastosowania w pokarmie.

b) Sole kwasów wielowartościowych, np. kwasu cytrynowego albo cyklicznych kwasów fosforowych.

Ilość pomocniczego środka strącającego i wartość pH przy strącaniu, jakie należy zastosować w celu uzyskania maksymalnej wydajności wyodrębnionego produktu proteinowego w tym stopniu, zależy od rodzaju pomocniczego środka strącającego i składu roztworu proteiny (zwłaszcza jego zawartości proteiny, mocy jonowej i składu jonowego). Te dwie zmienne: ilość pomocniczego środka do wytrącania i wartość pH podczas wytrącania nie są niezależne. I tak przy różnych wartościach pH przy wytrącaniu maksimum wydajności wyodrębnionego produktu otrzymuje się przy różnych ilościach dodanego pomocniczego środka strącającego. Fakt, że przy określonej wartości pH podczas wytrącania wydajność wyodrębnionego produktu przechodzi przez maksimum, jeśli dodaje się wzrastające ilości pomocniczego środka strącającego jest spowodowany tworzeniem rozpuszczalnych w wodzie kompleksów między proteinami i pomocniczym środkiem strącającym, gdy ten ostatni dodaje się w nadmiarze.

Zależność między wydajnością wyodrębnionego produktu, ilością pomocniczego środka strącającego i wartości pH podczas strącania jest taka, że można ją wytłumaczyć faktem, że siły elektrostatyczne odgrywają dominującą rolę w wytrącaniu protein, i że zmiana wartości pH wpływa na ładunek elektryczny zarówno pomocniczego środka strącającego, jak i protein. Kombinację wartości pH i ilości pomocniczego środka strącającego, która powinna być zastosowana w każdym specyficznym przypadku, można łatwo ustalić doświadczalnie. W jednym przypadku uzyskano maksimum wydajności wyodrębnionego produktu przy pH 5,1, gdy dodano 0,098 gramów karboksymetylocelulozy na gram rozpuszczonej proteiny, i przy pH 4,1, gdy zastosowano podwójną ilość pomocniczego środka strącającego.

Ilość pomocniczego środka strącającego związana z wyodrębnionym produktem proteinowym zmienia się z wartością pH przy wytrącaniu i liczbą grup kwasowych na gram pomocniczego środka strącającego. Im wyższą stosuje się wartość pH przy strącaniu, i im wyższa jest przeciętna liczba grup kwasowych pomocniczego środka strącającego na jednostkę ciężaru, tym mniejsza jest ilość pomocniczego środka strącającego związanego z proteiną w wyodrębnionym produkcie. Budowa cząsteczkowa (to znaczy stopień rozgałęzienia) pomocniczego środka strącającego oraz jego ciężar cząsteczkowy jest również ważny dla ilości pomocniczego środka strącającego, który będzie związany z wyodrębnionym produktem proteinowym.

Znaleziono, że najprostszym sposobem uzyskania wysokiej wydajności wyodrębnionego produktu proteinowego, łatwego do oddzielenia, który ma jednorodny skład, stanowi dodanie pomocniczego środka strącającego w postaci roztworu przy jednoczesnym mieszanii. Roztwór proteiny powinien mieć korzystnie wartość pH poza zakresem, w którym pomocniczy środek strącający działa jako substancja strącająca. Po dodaniu pomocniczego środka strącającego należy dodać substancję ustalającą wartość pH, mieszając, w ilości dostatecznie dużej do uzyskania przewidzianej wartości pH zawiesiny. Struktura wytrąconego osadu zależy od szybkości, z jaką dodaje się substancję regulującą wartość pH. Najlepszy wynik uzyskuje się, dodając ją powoli i dokładnie mieszając. Otrzymany wytrącony osad oddziela się przez odwirowanie albo sączenie i przemywa się w jednym albo kilku stopniach. Przemyty osad stanowi wyodrębniony produkt proteinowy.

Ani postać, w jakiej dodaje się pomocniczy środek strącający, ani kolejność, w jakiej dodaje się substancję regulującą wartość pH i pomocniczy środek strącający nie są same decydujące dla wydajności wyodrębnionego produktu. Można zatem również dodawać pomocniczy środek strącający w stanie stałym albo dodać substancję regulującą wartość pH przed dodaniem pomocniczego środka strącającego. Charakter substancji użytej do regulacji wartości pH nie ma dużego znaczenia. W celu obniżenia wartości pH można stosować zarówno kwasy organiczne jak i nieorganiczne albo gazy kwaśne. Jeśli stosuje się redukujące substancje

kwasowe, takie jak kwas askorbinowy, kwas siarkowy, albo dwutlenek siarki, to wyodrębnione produkty mają nieco jaśniejszą barwę, niż w przypadku stosowania kwasów nieredukujących.

5 Jeśli wyodrębniony produkt proteinowy wytrąca się w jednym stopniu (alternatywa 2, fig. 2), to pomocniczy środek strącający dodaje się bezpośrednio do alkalicznego roztworu proteinowego otrzymanego przez ekstrakcję materiału nasion. Następnie wyodrębniony produkt proteinowy strąca się przez dodanie kwasu w taki sam sposób, jak opisano dla drugiego stopnia w metodzie strącania dwustopniowego. Można oczywiście również dodać pomocniczy środek strącający po dodaniu tej części żądanej ilości kwasu.

10 Właściwości funkcjonalne wyodrębnionego produktu proteinowego, wytworzonego przez strącanie w obecności pomocniczego środka strącającego, są zależne od zawartości pomocniczego środka strącającego w wyodrębnionym produkcie i od charakteru pomocniczego środka strącającego. Wyodrębnione produkty proteinowe, wytworzone za pomocą pomocniczych środków strącających w sposób opisany w niniejszym opisie, mają zazwyczaj 15 wysoką zawartość suchej substancji przy stosowanym pH podczas strącania.

Jest to ważne dlatego, że ułatwia oddzielenie świeżo strąconego wyodrębnionego produktu i zmniejsza ryzyko strat produktu podczas późniejszych przemysłań wyodrębnionego produktu. 20 Przez odpowiednie przemyslanie uzyskuje się w opisanym procesie wyodrębniony produkt o obójnym smaku. Znaleziono również, że można wpływać na właściwości funkcjonalne produktu przez odpowiednią obróbkę następczą.

Zatem przez podwyższenie wartości pH wyodrębnionego produktu, po ostatnim stopniu przemyslania uzyskuje się doskonałe właściwości wiążące wodę, emulsyjne i stabilizujące pianę. Jeśli wyodrębnione produkty proteinowe wytwarza się w procesie strącania dwustopniowego, to te dwa stopnie strącania dają wyodrębnione produkty o różnych właściwościach funkcjonalnych. Te wyodrębnione produkty można stosować oddzielnie albo 25 zmieszane. Wyodrębnione produkty można również poddawać obróbce przez „przemyslanie” etanolem, acetonem albo innymi rozpuszczalnikami organicznymi. To polepsza znacznie barwę i smak wyodrębnionych produktów.

Wynalazek wyjaśniają następujące przykłady.

Przykład I. Nasiona rzepaku zawierające 8% wody poddano obróbce cieplnej w temperaturze 90°C w ciągu 18 minut w zewnętrznie ogrzewanym bębnie obrotowym. Układ mirozyny (układ hydrolizujący glikozynolany) został przez tę obróbkę całkowicie zdezaktywowany. Nasiona rozdrob- 30 niono w młynku płatkującym i ekstrahowano w typowym aparacie do ekstrakcji. Odtłuszczony produkt miele się następnie w dezintegratorze. Jeden kilogram mączki, przygotowanej w ten sposób, zdyspergowano w 16,5 litrach odjonizowanej wody w temperaturze pokojowej. Dodano 0,2 molarowy roztwór wodorotlenku sodu, mieszając, aż do uzyskania wartości pH zawiesiny 11,1.

35 Zawiesinę mieszano w ciągu 30 minut, utrzy-

mując stałą wartość pH przez dalsze dodawanie roztworu wodorotlenku sodu. Ogółem dodano 3,5 litra roztworu wodorotlenku sodu. Nierozpuszczony materiał oddzielono przez odwirowanie w wirówce periodycznej w ciągu pięciu minut do 3100 g. Do klarownego odwirowanego roztworu proteiny dodano, mieszając, 2% roztwór sześciometafosforanu sodu (produkt BDH, głównie $(\text{NaPO}_3)_6$) w wodzie. Na litr ekstraktu proteinowego dodano 60 ml roztworu sześciometafosforanu sodu. Proteinę wytrącono następnie przez obniżenie wartości pH mieszaniny do 4,9 przez dodanie rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego przy jednoczesnym mieszaniu. Osad oddzielono przez odwirowanie mieszaniny w ciągu pięciu minut w wirówce o działaniu nieciągłym, do 3100 g. Osad zawierał 25% suchej substancji i 14,5% azotu, oznaczonego w suchej substancji, co odpowiada zawartości 91% proteiny ($N \times 6,25$).

Wyodrębniony produkt przemywano przez dyspergowanie go w odjonizowanej wodzie, następnie osad oddzielono i wysuszono przez zamrażanie. Wyszuszony produkt miał jasną brunatną barwę. Przy zastosowaniu wyżej opisanego sposobu uległo wytrąceniu około 85% azotu wyekstrahowanego przy pH 11,1. Pomiar absorpcji przy 280 nm na spływającym materiale ze stopnia wytrącania wykazały, że praktycznie cała ilość protein wyekstrahowana przy pH 11,1 została całkowicie wytrącona. Ogółem otrzymano 0,28 kg wysuszonego wyodrębnionego produktu proteinowego. Produkt ten zawierał mniej niż 0,4 mg fosforu fitynowego na gram i mniej niż 0,03 mg glikozynolanów lub produktów jego rozkładu na gram.

Przykład II. Roztwór proteiny z nasion rzepaku przygotowano w sposób opisany w przykładzie I. Do ekstraktu proteinowego dodano wodny roztwór, zawierający 1% karboksymetylocelulozy (Cellugel 3000 Special, SCA, Szwecja). Dodano 160 ml roztworu Cellugel'u na litr ekstraktu proteinowego. Proteinę wytrącono następnie przez obniżenie wartości pH mieszaniny do 5,1 przez dodanie rozcieńczonego kwasu fosforowego. Mieszaninę odwirowano w ciągu pięciu minut w wirówce o działaniu nieciągłym do 3100 g. Osad zawierał 32% suchej substancji.

Wyodrębniony produkt przemyto w odjonizowanej wodzie i wysuszono przez zamrażanie. Wyszuszony przez zamrażanie wyodrębniony produkt miał barwę jasnobrunatną i zawierał 13,9% azotu, co odpowiada zawartości 89% proteiny ($N \times 6,25$). W ekstrakcie było wytrąconych około 85% związków azotu. Ogółem otrzymano 0,27 kg wyodrębnionego produktu na kilogram mączki z odtłuszczonych nasion rzepaku, zawierającego mniej niż 1,0 mg fosforu fitynowego na gram i mniej niż 0,06 mg glikozynolanów albo produktów ich rozkładu na gram.

Przykład III. Ekstrakt proteinowy z nasion rzepaku przygotowano w sposób opisany w przykładzie I. Do ekstraktu proteinowego dodano 1% roztwór Cellugel'u 3000 Special w wodzie przy jednoczesnym mieszaniu. Dodano 320 ml roztworu Cellugel'u na litr ekstraktu proteinowego i proteinę wytrącono następnie przez zredukowanie war-

tości pH mieszaniny do 4,1 stosując rozcieńczony kwas fosforowy. Mieszaninę odwirowano w ciągu pięciu minut w wirówce o działaniu nieciągłym do 3100 g. Zawartość suchej substancji w wyodrębnionym produkcie wynosiła 29,5%.

Wyodrębniony produkt przemyto w odjonizowanej wodzie i wysuszono przez zamrażanie. Wyszuszony produkt miał barwę jasnobrunatną. Zawartość azotu w wyodrębnionym produkcie wynosiła 13,1%, co odpowiada zawartości 82% proteiny ($N \times 6,25$). W wyżej opisany sposób wytrącono około 90% substancji azotowych z ekstraktu proteinowego. Ogółem otrzymano 0,30 kg wyodrębnionego produktu na kilogram mączki z odtłuszczonych nasion rzepaku. Wyodrębniony produkt zawierał mniej niż 1,3 mg fosforu fitynowego na gram i mniej niż 0,08 mg glikozynolanu albo produktów jego rozkładu na gram.

Przykład IV. Ekstrakt proteinowy z nasion rzepaku przygotowano w sposób opisany w przykładzie I. Do ekstraktu proteinowego dodano 0,5% roztwór λ -karagenianu w wodzie przy jednoczesnym mieszaniu. Dodano 320 ml roztworu λ -karagenianu na litr ekstraktu proteinowego, po czym proteinę wytrącono przez zredukowanie wartości pH mieszaniny do 5,3 za pomocą kwasu chlorowodorowego. Mieszaninę odwirowano potem w ciągu pięciu minut w wirówce o działaniu nieciągłym do 3100 g. Zawartość suchej substancji w wyodrębnionym produkcie wynosiła 13%.

Wyodrębniony produkt przemyto i wysuszono przez zamrażanie. Miał on jasnobrunatną barwę i zawierał 13,3% azotu w odniesieniu do suchej substancji, co odpowiada zawartości 83% proteiny ($N \times 6,25$). Ogółem otrzymano 0,34 kg wyodrębnionego produktu na kilogram odtłuszczonej mączki. Wyodrębniony produkt zawierał mniej niż 0,6 mg fosforu fitynowego na gram i mniej niż 0,08 mg glikozynolanów albo produktów ich rozpadu na gram.

Przykład V. Ekstrakt proteinowy z nasion rzepaku przygotowano w sposób opisany w przykładzie I. Do ekstraktu proteinowego dodawano 0,1 molowy kwas chlorowodorowy do uzyskania wartości pH mieszaniny 6,6. Utworzony osad usunięto przez odwirowanie w wirówce o działaniu nieciągłym do 3100 g w ciągu pięciu minut. Wypływający materiał stanowił przezroczysty roztwór o żółtej barwie. Osad, który zawierał 23% suchej substancji, przemyto odjonizowaną wodą, do której dodano 0,1 molowy kwas chlorowodorowy do uzyskania wartości pH tuż poniżej 6,6.

Wyodrębniony produkt wysuszono przez zamrażanie. Miał on brunatną barwę i zawierał 14,0% azotu, co odpowiada zawartości 87,5% proteiny ($N \times 6,25$). W ten sposób wytrącono około 40% związków azotu rozpuszczonych przy pH 11,1. Ogółem otrzymano 0,14 kg wysuszonego wyodrębnionego produktu proteinowego. W produkcie nie było można wykryć kwasu fitynowego. Wyodrębniony produkt zawierał mniej niż 0,03 mg glikozynolanów lub produktów ich rozpadu na gram.

Przykład VI. Do żółtego roztworu otrzymanego w przykładzie V przez oddzielenie świeżo strąconego wyodrębnionego produktu dodano 1%

roztwór Cellugel'u 3000 Special w odjonizowanej wodzie. Dodano 120 ml Cellugel'u na litr ekstraktu proteinowego. Roztwór mieszano i dodawano kwas chlorowodorowy dotąd, aż wartość pH mieszaniny wynosiła 5,0. Utworzony osad odzyskano przez odwirowanie w ciągu pięciu minut w wirówce o działaniu nieciągłym do 3100 g. W ten sposób wytrącono około 80% związków azotu w żółtym roztworze proteinowym.

Osad, który zawierał 35% suchej substancji, przemyto odjonizowaną wodą i wysuszono przez zamrażanie. Miał on barwę żółtą i zawierał 15,0% azotu, co odpowiada zawartości 94% proteiny ($N \times 6,25$). W tym stopniu strącania otrzymano 0,16 kg suchego produktu. Pomiary adsorpcji przy 280 nm wykazały, że wypływający produkt z tego wytrącania zawierał bardzo mało proteiny, i że osiągnięto prawie całkowite wytrącenie protein rozpuszczonych przy pH 11,1. Wyodrębniony produkt zawierał mniej niż 0,9 mg fosforu fitynowego na gram i mniej niż 0,03 mg glikozynolanów lub produktów ich rozpadu na gram.

Przykład VII. 70 kg odtłuszczonej, poddanej obróbce cieplnej mączki z nasion rzepaku zdyspergowano w 680 litrach odjonizowanej wody w temperaturze pokojowej. Użyta mączka z nasion rzepaku zawierała 94% suchej substancji i 6,5% azotu w odniesieniu do suchej substancji. Mączka miała wartość PDI 33% i rozpuszczalność azotu przy pH 11,5 wynosiła 69%. Do zawiesiny dodano, mieszając, 2 molowy roztwór wodorotlenku sodu aż do osiągnięcia pH zawiesiny 11,2. Zawiesinę wytrząsano w ciągu 45 minut, utrzymując jej stałą wartość pH przez dodawanie roztworu wodorotlenku sodu. Ogółem dodano 20 litrów 2 molowego roztworu NaOH.

Nierozpuszczony materiał usunięto w wirówce pracującej w sposób ciągły. Ogółem otrzymano 230 kg szlamu o zawartości 16,5% suchej substancji. 27 litrów 2% roztworu sześciometafosforanu sodu w wodzie (jakość BDH) dodano do 230 litrów wypływającego produktu przy jednoczesnym wytrząsaniu. Proteinę strącono przez dodanie 5 litrów 1,8 molowego roztworu HCL, po czym wartość pH mieszaniny wynosiła 4,9. Osad oddzielono w wirówce działającej w sposób ciągły. Przez analizę strumieni wpływających i wypływających z wirówki o ciągłym działaniu stwierdzono, że 77% zawartości azotu ze strumienia wchodzącego do wirówki zostało oddzielone w postaci wytrąconego osadu. Osad przemyto dwukrotnie za pomocą odjonizowanej wody. Straty wyodrębnionego produktu w stopniach przemylwania były bardzo małe i woda z przemylwania praktycznie nie zawierała materiału w postaci zawiesiny. Wysuszony osad miał barwę beżową i zawierał 14,5% azotu, co odpowiada zawartości 90,6% proteiny ($N \times 6,25$). Wyodrębniony produkt zawierał mniej niż 0,4 mg fosforu fitynowego na gram.

Przykład VIII. Do 230 litrów oczyszczonego alkalicznego roztworu proteiny, otrzymanego w doświadczeniu opisanym w przykładzie VII, dodano przy jednoczesnym wytrząsaniu 72 litrów 1% wodnego roztworu karboksymetylocelulozy (Cellugel 3000 Special, SCA., Szwecja). Proteinę wytrą-

ceno przez obniżenie wartości pH mieszaniny do 5,1 przez dodanie kwasu chlorowodorowego przy jednoczesnym mieszaniu. Ogółem dodano 10 litrów 1,8 molowego HCL. Osad oddzielono w wirówce o działaniu ciągłym.

Analiza strumieni wpływających i wypływających z wirówki wykazała, że 82% azotu zawartego w strumieniu wchodzącym do wirówki odzyskano w postaci wytrąconego osadu. Osad przemyto za pomocą odjonizowanej wody i ponownie odwirowano. Woda z przemylwania z wirówki nie zawierała materiału w postaci zawiesiny. Wytrącony osad poddano suszeniu rozpryskowemu i miał on barwę beżową. Zawartość azotu w osadzie wynosiła 14,1%, co odpowiada zawartości 88% proteiny ($N \times 6,25$), i zawierał on mniej niż 1 mg fosforu fitynowego na gram.

Przykład IX. Do 515 litrów oczyszczonego alkalicznego ekstraktu proteinowego, przygotowanego w sposób opisany w przykładzie VII, dodano mieszając, rozcieńczony kwas chlorowodorowy do osiągnięcia wartości pH mieszaniny 6,6. Ogółem dodano 30 litrów 0,5 molowego HCL. Utworzony osad oddzielono w wirówce o działaniu ciągłym. Analiza strumieni wpływających i wypływających z wirówki wykazała, że 35% azotu zawartego w strumieniu wchodzącym do wirówki zostało oddzielone w postaci osadu. Osad przemyto odjonizowaną wodą i poddano suszeniu rozpryskowemu. Miał on barwę beżową i zawierał 15,2% azotu, co odpowiada 95,0% zawartości proteiny ($N \times 6,25$). Zawartość fosforu fitynowego w wyodrębnionym produkcie była mniejsza niż 0,2 mg na gram.

Przykład X. Do 470 litrów wypływającego materiału, otrzymanego przez oddzielenie wyodrębnionego produktu proteinowego w przykładzie IX, dodano mieszając, 130 litrów 1% roztworu Cellugel'u 3000 Special w odjonizowanej wodzie. Mieszając dodawano rozcieńczony kwas chlorowodorowy do uzyskania wartości pH mieszaniny 4,9. Ogółem dodano 15 litrów 0,5 molowego HCL. Utworzony osad oddzielono przez odwirowanie w wirówce o działaniu ciągłym i przemyto odjonizowaną wodą. Osad był bardzo łatwy do oddzielenia i straty wyodrębnionego produktu podczas przemylwania były bardzo małe. Osad poddano suszeniu rozpryskowemu. Miał barwę beżową i zawierał 14,3% azotu, co odpowiada zawartości 89,4% proteiny ($N \times 6,25$). Zawartość fosforu fitynowego w produkcie była mniejsza niż 0,9 mg na gram.

Przykład XI. Jeden kilogram poddanej obróbce cieplnej odtłuszczonej mączki z nasion rzepaku zdyspergowano w 13 litrach odjonizowanej wody w temperaturze 40°C. Mieszając dodano 0,2 molowy roztwór wodorotlenku potasu do uzyskania wartości pH zawiesiny 11,0. Zawiesinę wytrząsano w ciągu 30 minut w temperaturze 40°C, utrzymując wartość pH 11,0 przez dalsze dodawanie roztworu wodorotlenku potasu. Ogółem dodano 7 litrów roztworu wodorotlenku sodu. Nierozpuszczoną pozostałość mączki oddzielono przez odwirowanie w wirówce o działaniu nieciągłym w ciągu pięciu minut do 3100 g.

Do wypływającego materiału dodano, mieszając, 1% roztwór karboksymetylocelulozy w wodzie

(Cellugel 3000 Special, SCA, Szwecja). Dodano 160 ml roztworu karboksymetylocelulozy na litr ekstraktu proteinowego. Proteinę wytrącono przez obniżenie wartości pH mieszaniny do 4,6 przez dodanie rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego przy jednoczesnym mieszaniu. Osad oddzielono przez odwirowanie w ciągu pięciu minut w wirowce komorowej do 3100 g. Osad zawierał 23,2% suchej substancji i 13,7% azotu w przeliczeniu na suchą substancję, co odpowiada zawartości 85,7% proteiny ($N \times 6,25$). Wyodrębniony produkt przemyto przez zdyspergowanie w całkowicie odjonizowanej wodzie, i osad oddzielono i wysuszono przez zamrażanie. Wysuszony produkt miał jasnobrunatną barwę.

W sposób wyżej opisany wytrącono około 87% związków azotu rozpuszczonego przy pH 11,0. Ogółem otrzymano 0,30 kg wyodrębnionego produktu na kilogram odtłuszczonej mączki z nasion rzepaku. Zawartość fosforu fitynowego w wyodrębnionym produkcie była mniejsza niż 1 mg na gram.

Na załączonym rysunku fig. 1 przedstawia rozpuszczalność substancji zawierających azot (x) i fosforu fitynowego (o) jako funkcję wartości pH, fig. 2 przedstawia schemat procesu według wynalazku, fig. 3 przedstawia wydajność wyodrębnionego produktu (x), zawartość proteiny (o) i zawartość suchej substancji w wyodrębnionym produkcie (Δ) jako funkcję wartości pH w pierwszym stopniu wytrącania.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wyodrębniania produktów proteinowych, o małej zawartości kwasu fitynowego albo jego związków, z nasion gatunku Brassica albo Crambe, **znamienny tym**, że w temperaturze 0°C—70°C proteinę z wodnej zawiesiny materiału z nasion przy pH rzędu 10,5—12, w którym to zakresie kwas fitynowy w materiale z nasion jest obecny w postaci trudno rozpuszczalnych związków albo tworzy także związki, podczas gdy w tych samych warunkach rozpuszczalność proteiny jest wysoka, po usunięciu substancji nierozpuszczalnych przez

odwirowanie albo przesączenie, wytrąca się z roztworu przez dodanie kwasu i pomocniczych środków strącających, i utworzony osad oddziela się przez odwirowanie albo przesączenie, i przemywa w celu usunięcia pozostałych resztek ługu macierzystego.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że dodaje się sole metali wielowartościowych w niewielkich ilościach tak, aby wodna zawiesina materiału z nasion zawierała jony metalu wielowartościowego w ilości wystarczającej do przeprowadzenia kwasu fitynowego w postać nierozpuszczalną.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wytrącanie protein przeprowadza się w dwóch stopniach, przy czym pierwszy obejmuje wytrącanie za pomocą kwasu w zakresie pH 3,5—8,5 i drugi obejmuje uzupełniające wytrącanie za pomocą pomocniczego środka strącającego, składającego się z kwaśnego polielektrolitu albo soli kwasu wielowartościowego, i to końcowe wytrącanie przeprowadza się w zakresie pH 3,0—6,5, po nastawieniu wartości pH, jeśli to jest potrzebne.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wytrącanie protein przeprowadza się w jednym stopniu, przy wartości pH rzędu 3,0—6,5 i jako pomocniczy środek strącający stosuje się kwaśny polielektrolit lub sól kwasu wielowartościowego.

5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym** że jako kwaśny polielektrolit stosuje się: karboksymetylocelulozę, polifosforany, heksametafosforan, alginian, kwas pektynowy, karagenian, furcelinę, skrobię, albo pochodne skrobi.

6. Sposób według zastrz. 3 albo 4, **znamienny tym**, że jako sole kwasu wielowartościowego stosuje się cytryniany albo cykliczne polifosforany.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że oddzieloną nierozpuszczoną pozostałość przeprowadza się ponownie w zawiesinę w alkalicznym roztworze wodnym, mającym wartość pH rzędu 10,5—12, w celu wyekstrahowania pozostałej rozpuszczalnej proteiny, i ten proces powtarza się w razie potrzeby kilkakrotnie.

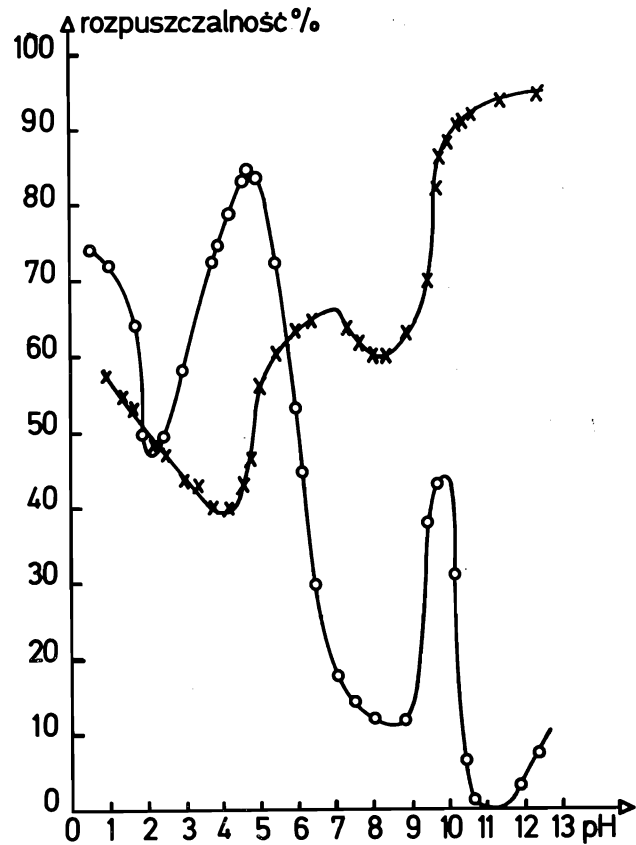


Fig. 1

10 631/ZR1-MD

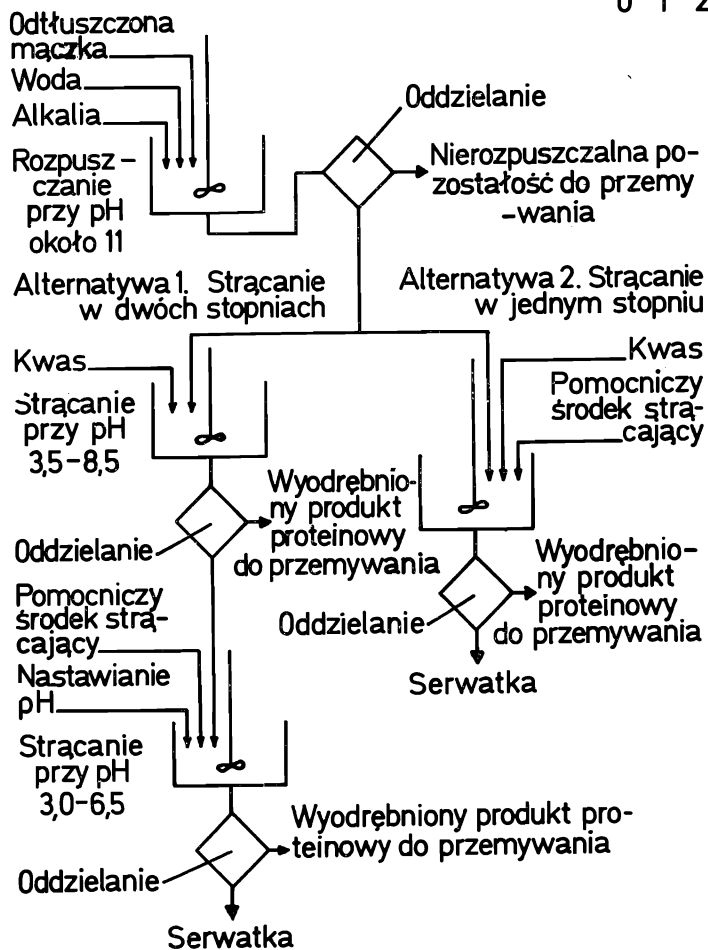


Fig. 2

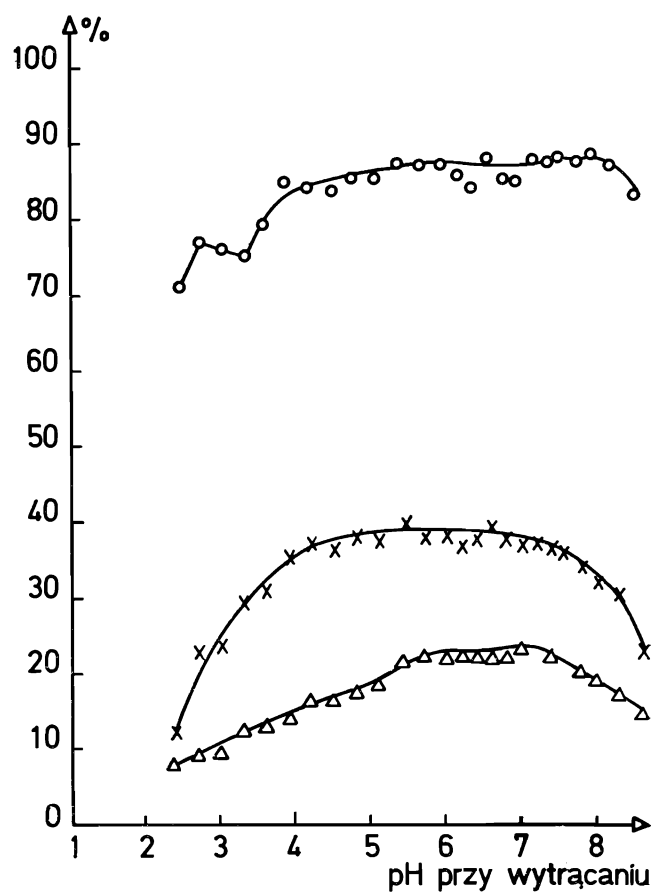


Fig. 3