



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년12월29일
(11) 등록번호 10-0934200
(24) 등록일자 2009년12월18일

(51) Int. Cl.

A23J 1/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7014394

(22) 출원일자 2002년05월03일

심사청구일자 2007년04월06일

(85) 번역문제출일자 2003년11월04일

(65) 공개번호 10-2004-0026651

(43) 공개일자 2004년03월31일

(86) 국제출원번호 PCT/CA2002/000650

(87) 국제공개번호 WO 2002/89597

국제공개일자 2002년11월14일

(30) 우선권주장

60/288,415 2001년05월04일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US06005076 A1

전체 청구항 수 : 총 23 항

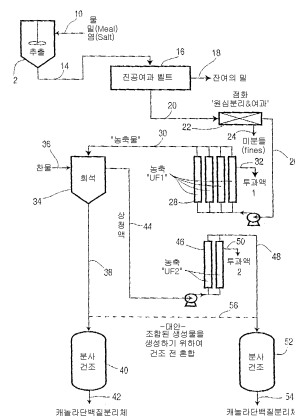
심사관 : 권오희

(54) 오일 시드 단백질 분리체의 제조

(57) 요약

오일 시드 단백질 분리체들, 특히 캐놀라 단백질 분리체는, 오일 시드 단백질이 오일 시드 밀로부터 추출되고, 상기 수용성 단백질 용액은 적어도 200g/L의 단백질 함량으로 농축되고, 상기 농축된 단백질 용액은 15℃ 이하 온도를 가지는 찬물에 첨가되어 단백질 미셀들을 형성하고, 상기 단백질 미셀들은 단백질 미셀 덩어리(PMM)를 제공하기 위하여 침전되는 방법에 의해 100중량(Nx6.25) 이상의 고순도수준으로 생성된다. 단백질 미셀 덩어리는 상청액으로부터 분리되어 건조될 수 있다. 상청액은, 상청액을 농축한 후 상기 농축된 상청액을 건조하는 것에 의해 추가적인 오일 시드 단백질 분리체를 회수하여, 90 중량% 이상의 단백질 함량을 가지는 단백질 분리체를 생성한다. 농축된 상청액은 일부 또는 전부의 PMM과 다양한 비율들로 혼합될 수 있고, 상기 혼합물은 건조되어 적어도 약 90 중량%의 단백질 함량을 가지는 단백질 분리체를 생성한다.

대표도 - 도1



(30) 우선권주장

60/326,987	2001년10월05일	미국(US)
60/331,066	2001년11월07일	미국(US)
60/333,494	2001년11월28일	미국(US)
60/374,801	2002년04월24일	미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 5℃ 이상의 온도에서 오일 시드 밀을 추출하여, 상기 오일 시드 밀에서 단백질의 용해화를 일으키고 5 내지 30g/L의 단백질 함량 및 5 내지 6.8의 pH를 가지는 수용성 단백질 용액을 형성하는 단계,
- (b) 상기 수용성 단백질 용액을 잔여의 오일 시드 밀로부터 분리하는 단계,
- (c) 선택성 막 기술(selective membrane technique)을 이용하여 일정한 이온세기를 유지하면서 상기 수용성 단백질 용액의 단백질 농도를 200g/L 이상으로 증가시켜 농축된 단백질 용액을 제공하는 단계,
- (d) 상기 농축된 단백질 용액을 15℃이하 온도의 찬물에서 희석시켜 단백질 미셀들(protein micelles)을 형성하는 단계,
- (e) 상기 단백질 미셀들을 침전시켜 무정형의 끈끈한 젤라틴성인 글루텐성미셀 덩어리를 형성하는 단계, 및
- (f) Kjeldahl 질소x6.25법에 측정된 바에 따라 건중량에 대하여 100 중량% 이상의 단백질 함량을 가지는 상청액 으로부터 단백질 미셀 덩어리를 회수하는 단계를 포함하는 단백질 분리체의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, (a) 단계에서의 상기 오일 시드 밀의 상기 추출은 0.10 이상의 이온세기 및 5 내지 6.8의 pH를 가진 수용성 식용 염 용액을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, (a) 단계에서의 상기 오일 시드 밀의 상기 추출은 10 내지 30분간 상기 수용성 식용 염 용액의 교반으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 2항 또는 제3항에 있어서, 상기 추출단계시 상기 수용성 식용 염 용액에서의 오일 시드 밀의 농도는 5 내지 15 중량%이고 그 추출단계를 거친 상기 수용성 단백질 용액은 10 내지 25g/L의 농도를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, (a) 단계에서의 상기 오일 시드 밀의 추출은 0.10 이상의 이온세기 및 6.8 내지 9.8의 pH를 가지는 수용성 식용 염 용액을 이용하여 수행되고, 상기 잔여의 오일 시드 밀로부터 수용성 단백질 용액을 분리하는 단계에서의 수용성 단백질 용액의 pH는 5 내지 6.8로 조정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 오일 시드 밀은 캐놀라 오일 시드 밀이고, (b) 단계에서의 잔여의 캐놀라 시드 가루로부터 수용성 단백질 용액의 상기 분리 후에, 수용성 단백질 용액은 상기 수용성 단백질 용액의 투석 여과, 또는 수용성 단백질 용액에 분말형 활성 탄소인 색소 흡착제를 혼합하고 상기 수용성 단백질 용액으로부터 색소 흡착제를 제거하는 것 중 어느 하나에 의한 색소 제거 단계를 거치는 방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 오일 시드 밀은 물로 추출된 후 식용 염이 첨가되는 것에 의해 0.10 이상의 이온세기를 가진 수용성 단백질 용액을 제공하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서, (c) 단계에서의 상기 수용성 단백질 용액의 농축은 20℃ 내지 60℃의 온도에서 한외여과에 의해 수행되어 250g/L 이상의 단백질 함량을 가진 농축된 단백질 용액을 생성하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 농축된 단백질 용액은 농축된 단백질 용액의 점도를 감소시키거나 회석시 미셀 형성을 불가능하게 하는 온도를 초과하지 않도록 20℃ 이상의 온도로 가온되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 농축된 단백질 용액은 10℃미만의 온도를 가지는 물에 농축된 단백질 용액을 첨가함으로써, 15배 이하로 회석되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 회수된 단백질 미셀 덩어리는 단백질성 분말로 건조되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 오일 시드 밀은 캐놀라 시드 밀이며, 단백질 미셀 덩어리의 회수단계 이후, 상기 상청액은 상기 오일 시드 밀로부터 추가량의 단백질 분리체를 회수하기 위하여 처리되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 추가량의 단백질 분리체는, (a) 상청액을 100 내지 400g/L의 단백질 농도로 농축하고, 상기 농축된 상청액을 건조하는 것에 의해, 또는 (b) 상청액을 100 내지 400g/L의 단백질 농도로 농축하고, 상기 농축된 상청액을 회수된 단백질 미셀 덩어리와 혼합하고, 상기 혼합물을 건조하는 것에 의해, 또는 (c) 상청액을 100 내지 400g/L의 단백질 농도로 농축하고, 상기 농축된 상청액의 일부를 상기 회수된 단백질 미셀 덩어리의 일부 또는 전부와 혼합하고, 그 혼합물을 건조하는 것에 의해, 상청액으로부터 회수되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 (c)에서의 농축된 상청액의 잔여물은 건조되고 상기 (c)에서의 회수된 단백질 미셀 덩어리의 잔여물은 건조되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1항에 있어서, (d) 단계에서의 상기 회석, (e) 단계에서의 상기 침전 및 (f) 단계에서의 상기 회수에 대한 대안으로서, 상기 농축된 단백질 용액은 투석되어 염성분을 감소시키고 단백질 미셀들의 형성을 야기하며, 상기 투석된 농축 단백질 용액을 건조함으로써 Kjeldahl 질소x6.25법에 의해 측정된 바에 따라 건중량에 대하여 100 중량% 이상의 단백질 함량을 가지는 단백질 분리체로 회수되는 방법.

청구항 16

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 오일 시드 밀은 캐놀라 오일 시드 밀, 유채종자 밀(rapeseed meal) 또는 겨자 시드 밀(mustard seed meal)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 캐놀라 오일 시드 밀은 냉압 캐놀라 오일 시드 밀이거나, 비-유전변형 캐놀라 오일 시드 밀로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 13항의 방법에 의해 생성된 것으로, Kjeldahl 질소x6.25에 의해 측정된 바에 따라 건중량에 대하여 90 중량% 이상의 단백질 함량을 가지는 캐놀라 단백질 분리체.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제 2항에 있어서, (a) 단계에서의 상기 오일 시드 밀의 상기 추출은 0.15 내지 0.6의 이온세기 및 5.3 내지 6.2의 pH를 가진 수용성 식용 염 용액을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 5항에 있어서, (a) 단계에서의 상기 오일 시드 밀의 추출은 0.15 내지 0.6의 이온세기 및 6.8 내지 9.8의 pH를 가지는 수용성 식용 염 용액을 이용하여 수행되고, 상기 잔여의 오일 시드 밀로부터 수용성 단백질을 용액을 분리하는 단계에서의 수용성 단백질 용액의 pH는 5.3 내지 6.2로 조정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 9항에 있어서, 상기 농축된 단백질 용액은 농축된 단백질 용액의 점도를 감소시키거나 희석시 미셀 형성을 불가능하게 하는 온도를 초과하지 않도록 25℃ 내지 40℃의 온도로 가온되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 10항에 있어서, 상기 농축된 단백질 용액은 10℃미만의 온도를 가지는 물에 농축된 단백질 용액을 첨가함으로써, 10배 이하로 희석되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 13항에 있어서, 상기 추가량의 단백질 분리체는, (a) 상청액을 200 내지 300g/L의 단백질 농도로 농축하고, 상기 농축된 상청액을 건조하는 것에 의해, 또는 (b) 상청액을 200 내지 300g/L의 단백질 농도로 농축하고, 상기 농축된 상청액을 회수된 단백질 미셀 덩어리와 혼합하고, 상기 혼합물을 건조하는 것에 의해, 또는 (c) 상청액을 200 내지 300g/L의 단백질 농도로 농축하고, 상기 농축된 상청액의 일부를 상기 회수된 단백질 미셀 덩어리의 일부 또는 전부와 혼합하고, 그 혼합물을 건조하는 것에 의해, 상청액으로부터 회수되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

명세서

기술분야

<1> 본 발명은, 오일 시드 단백질 분리체(oil seed protein isolate), 보다 상세하게는 캐놀라(canola) 단백질 분리체의 개선된 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

<2> 이 문서의 양수인에게 양도되고 여기서 참조용으로 포함된, 미국특허 제5,844,086호 및 제6,005,076호("Murray II")에는, 캐놀라(canola) 오일 시드를 포함한 상당한 지방 함량을 가진 오일 시드 밀(oil seed meal)로부터 단백질을 분리하는 단백질분리방법이 서술되어 있다. 이 방법과 관련된 단계들은, 오일 시드 밀로부터 단백질성 물질(proteinaceous material) 및 지방(fat)을 용해시키는 단계, 및 그 수용성 단백질 용액으로부터 지방을 제거하는 단계를 포함한다. 수용성 단백질 용액은, 지방 제거 단계 전후에 잔여의 오일 시드 밀로부터 분리될 수 있다. 그 다음, 지방제거된(defatted) 단백질 용액은, 실질적으로 일정한 이온세기를 유지하면서 단백질 농도를 증가시키기 위하여 농축된 후, 그 농축된 단백질 용액은 추가적인 지방 제거 단계를 거칠 수 있다. 그 다음, 농축된 단백질 용액은 희석되어, 미셀형(micellar form)으로 분리된 단백질 방울들로서, 고도로 회합된 단백질 분자들인 안개성 덩어리(cloud-like mass)의 형성을 야기한다. 단백질 미셀들은 침전되어, 잔여의 수상(aqueous phase)으로부터 분리되어 건조된 "단백질 미셀 덩어리(protein micellar mass)" 또는 PMM이라 불리는, 회합되고

(aggregated) 합체되고(coalesced) 조밀하고(dense) 무정형(amorphous)이며, 끈끈한(sticky) 글루텐성(gluten-like) 단백질 분리체 덩어리를 형성한다.

<3> 단백질 분리체는 적어도 약 90중량%의 단백질 함량(Kjeldahl Nx6.25로 측정됨)을 가지고, 실질적으로 비변성되며(시차주사열량계(differential scanning calorimetry)로 측정됨), 낮은 잔여지방 함량을 가진다. 여기서 사용된 "단백질 함량(protein content)"의 용어는, 건량(dry weight)으로 나타낸 단백질 분리체에서의 단백질의 양을 일컫는다. 이 방법을 사용하여 얻어진 단백질 분리체의 수득율로 표시되는 것으로, 오일 시드 밀로부터 추출되어 건단백질 분리체(dried protein isolate)로서 회수된 단백질의 비율은, 일반적으로 40중량%미만, 전형적으로 약 20 중량%미만이다.

<4> 상술된 MurrayII 특허에서 서술된 방법은, 미국특허 제4,208,323호(MurrayIB)에서 서술된, 오일 시드들을 포함한 다양한 단백질원물질들(protein source materials)로부터 단백질 분리체를 형성하는 방법의 변형 및 개량으로서 발전된 것이다. 그러나, 미국특허 제4,208,323호가 발행된 1980년에 이용가능한 오일 시드 밀들은, MurrayII 특허들의 시기에 이용가능한 캐놀라 오일 시드 밀들의 지방혼합수준들을 가지지 않았기 때문에, 미국특허 제4,208,323호의 방법은 MurrayII 방법에 따라 제조된 그러한 오일 시드 밀들로부터 90 중량% 이상의 단백질 함량을 가지는 단백질성 물질들을 생성할 수 없었다. 미국특허 제4,208,323호에는, 개시물질로서 유채종자박(rapeseed meal, 캐놀라)을 이용하여 수행된 어떠한 특정실험들의 서술이 없다.

<5> 미국특허 제4,208,323호는, 회식 전에 농축단계를 도입하여 PMM을 형성함으로써, 미국특허 제4,169,090호 및 제4,285,862호(MurrayIA)에 서술된 방법에 대한 개량으로 고안되었다. MurrayIA특허들은 유채종자(rapeseed)에 관련한 하나의 실험을 서술하고 있지만 그 생성물의 순도표시는 제공하지 않는다. MurrayIB특허에 서술된 농축단계는 MurrayIA방법에 대하여 단백질 분리체의 수득율을 약 20% 개선시켰다.

발명의 상세한 설명

<6> 상기 종래기술들을 오일 시드들, 특히 캐놀라에 적용함으로써 오일 시드들로부터 추출된 단백질의 비율인 건단백질 분리체의 수득율을 적어도 약 40 중량% 및 때때로 훨씬 높은, 적어도 약 80 중량%의 개선된 수득물들, 및 Kjeldahl 질소 변환율 Nx 6.25에서 적어도 약 100 중량%의 단백질 분리체들의 높은 순도를 얻음으로써 종래기술의 단백질 분리체 제조방법들을 개선할 수 있다는 것을 알았다.

<7> 또한, MurrayIA 및 IB, 및 MurrayII의 방법을 캐놀라 밀에 적용하는 경우, PMM 형성단계에서 상청액을 버리는 결과로 인해 밀(meal)로부터 추출된 캐놀라 단백질의 상당한 정도는 잃는다는 것을 알았다. 따라서, 종래방법에 대한 추가적인 개선점으로, 일반적으로 불순물들을 제거하기 위한 농축단계 및 그 농축물을 건조함으로써 상청액 중에 존재하는 단백질을 회수하는 단계로, 단백질의 최종수득율을 개선하는 것이 제공된다. 일반적으로 상청액으로부터 얻어진 생성물은 100%보다 높은 단백질 함량(Nx 6.25)을 가지며, 이는 신규한 캐놀라 단백질 분리체 생성물이다. 그러한 신규한 생성물은 본 발명의 다른 측면을 제공한다.

<8> 종래 방법에 대한 추가적인 개선점으로, 농축된 상청액이 PMM과 혼합되고 그 혼합물이 건조될 수 있다는 것이다. 또는, 농축된 상청액의 일부가 PMM의 적어도 일부와 혼합되고 그 혼합물이 건조될 수 있다. 후자 생성물들은 신규한 캐놀라 단백질 분리체 생성물들이고, 이는 본 발명의 다른 측면을 구성한다.

<9> 본 발명의 제 1 측면에 따르면, (a) 적어도 약 5°C 및 바람직하게는 약 35°C까지의 온도에서 오일 시드 밀을 추출하여, 오일 시드 밀에서 단백질의 용해화를 일으키고 약 5 내지 약 25g/L의 단백질 함량 및 약 5 내지 약 6.8의 pH를 가지는 수용성 단백질 용액을 형성하는 단계, (b) 상기 수용성 단백질 용액을 잔여의 오일 시드 밀로부터 분리하는 단계, (c) 선택성 막 기술(selective membrane technique)을 이용하여 실질적으로 일정한 이온세기를 유지하면서 상기 수용성 단백질 용액의 단백질 농도를 적어도 약 200g/L로 증가시켜 농축된 단백질 용액을 제공하는 단계, (d) 상기 농축된 단백질 용액을 약 15°C이하 온도의 찬물에서 회식시켜 단백질 미셀들(protein micelles)을 형성하는 단계, (e) 단백질 미셀들을 침전시켜 무정형이고, 끈끈하며, 아교질인 글루텐성 단백질 미셀 덩어리를 형성하는 단계, 및 (f) Kjeldahl 질소x6.25로 측정된 바에 따라 건중량에 대하여 적어도 약 100 중량%의 단백질 함량을 가지는 상청액으로부터 단백질 미셀 덩어리를 회수하는 단계를 포함하는 단백질 분리체의 제조방법이 제공된다. 회수된 단백질 미셀 덩어리는 건조될 수 있다. 단백질 분리체는 실질적으로 비변성된다(시차주사열량계로 측정됨).

<10> 단백질 미셀 덩어리 형태인 단백질 분리체 생성물은, 이하에서 "글루텐성(gluten-like)"으로 표현된다. 이러한 표현은, 분리체의 모양 및 감촉이 활성 밀 글루텐(vital wheat gluten)과 유사한 것을 가리키는 것이며, 글루텐

과의 화학적 동일성을 가리키는 것은 아니다.

- <11> 본 방법의 하나의 실시예에서, 침전 단계에서의 상청액은 농축되고, 그 농축된 상청액은 건조되어 건중량에 대하여 적어도 약 90 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가진 단백질 분리체로 제공된다. 그러한 단백질 분리체는 신규한 생성물이며 본 발명의 다른 측면에 따라 제공된다.
- <12> 본 방법의 다른 실시예에서, 침전 단계에서의 상청액은 농축되고, 그 농축된 상청액은 건조 전에 단백질 미셀 덩어리와 혼합되며 그 혼합물은 건조되어, 건중량에 대하여 적어도 약 90 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가지는 단백질 분리체로 제공된다. 그러한 단백질 분리체는 신규한 생성물이며 본 발명의 다른 측면에 따라 제공된다.
- <13> 본 발명의 또 다른 실시예에서, 침전 단계에서의 상청액은 농축되고 그 농축된 상청액의 일부만이 건조 전에 적어도 일부의 단백질 미셀 덩어리와 혼합되어, 건중량에 대하여 적어도 약 90 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가지는 본 발명에 따른 다른 신규한 단백질 분리체들을 제공한다.
- <14> 본 발명의 방법에서의 중요 단계 및 이전에 수행된 것보다 적어도 100 중량%의 순도들로 단백질 분리체의 고수득율을 얻기 위한 비결은, 단백질 용액을 상술된 종래방법들보다 훨씬 높은 값인 적어도 약 200g/L의 단백질 함량으로 농축하는 것이다. 또 다른 중요 단계는, 단백질 미셀 덩어리만이 회수된 경우, 찬물에서 1:15 미만의 희석비율로 희석하기 전, 필요하다면 농축된 단백질 용액을 가온하는(warming) 단계이다. 변수들의 이러한 특정조합은 종래기술에 서술되지 않았을 뿐만 아니라, 여기에 서술된 고단백질 수득율 및 고순도 단백질 분리체의 유리한 결과들도 서술되지 않았다. 특히 캐놀라 밀의 경우에, 단백질 수득율을 개선하기 위한 추가단계는, PMM 형성 및 침전 단계에서 상청액으로부터 추가량의 단백질의 회수이다.
- <15> 본 발명의 다른 측면에 따라, (a) 적어도 약 5℃의 온도에서 캐놀라 오일 시드 밀을 추출하여, 오일 시드 밀에서 단백질의 용해화를 일으키고 약 5 내지 약 25g/L의 단백질 함량 및 약 5 내지 약 6.8의 pH를 가지는 수용성 단백질 용액을 형성하는 단계, (b) 상기 수용성 단백질 용액을 잔여의 캐놀라 오일 시드 밀로부터 분리하는 단계, (c)상기 수용성 단백질 용액에서 색소(pigment)를 제거하는 단계, (d) 선택성 막 기술(selective membrane technique)을 이용하여 실질적으로 일정한 이온세기를 유지하면서 상기 수용성 단백질 용액의 단백질 농도를 적어도 약 200g/L로 증가시켜 농축된 단백질 용액을 제공하는 단계, (e) 상기 농축된 단백질 용액을 약 15℃이하 온도의 찬물에서 희석시켜 단백질 미셀들을 형성하는 단계, (f) 단백질 미셀들을 침전시켜 무정형이고, 끈끈하며, 야고질인 글루텐성 미셀 덩어리를 형성하는 단계, 및 (g) Kjeldahl 질소x6.25로 측정된 바에 따라 건중량에 대하여 적어도 약 90 중량%의 단백질 함량을 가지는 상청액으로부터 단백질 미셀 덩어리를 회수하는 단계를 포함하는 감소된 착색의 단백질 분리체를 제조하는 방법이 제공된다.
- <16> 이하의 방법에 따라 제조된 단백질 분리체는, 가공식품들의 단백질강화(protein fortification), 오일들의 유화작용(emulsification), 구운제품에서의 바디포머들(body formers) 및 가스고정제품들에서의 기포제(forming agents)와 같은 단백질 분리체의 기존의 응용들에서 사용될 수 있다. 또한, 단백질 분리체는, 육류대체품들에 유용한 단백질섬유소들로 형성될 수 있고, 겨란흰자가 바인더로 사용되는 식품들에서의 겨란흰자의 대체품 또는 대체품으로서 사용될 수 있다. 캐놀라 단백질 분리체는 영양보충물들로 사용될 수도 있다. 캐놀라 단백질 분리체의 다른 용도들로는, 애완동물먹이, 동물사료 및 공업 및 미용용 응용물들, 및 개인건강제품(personal care products)들이 있다.
- <17> 본 발명의 방법의 초기단계는, 콩(soybean), 전통의 유채종자(traditional rapeseed), 전통의 아마(traditional flax), 리놀라(linola), 해바라기(sunflower) 및 겨자(mustard)오일 시드 밀들과 같은 다른 오일 시드 밀들에도 적용할 수 있지만, 특히 캐놀라 밀인 오일 시드 밀로부터 단백질성 물질을 용해시키는 것에 관련한다. 본 발명은, 특히 캐놀라 시드 밀에 대하여 이하에서 설명된다.
- <18> 캐놀라 시드 밀로부터 회수된 단백질성 물질은, 캐놀라시드 또는 다른 오일 시드에서 천연적으로 생성된 단백질일 수 있고, 또는 유전조작에 의해 변형된 것으로 천연단백질의 소수성(hydrophobic) 및 극성(polar) 특성을 지니는 단백질일 수 있다. 캐놀라 밀은, 예컨대 뜨거운헥산추출법(hot hexane extraction method) 또는 냉오일압출법(cold oil extrusion method)으로부터 생성되는 것으로, 다양한 수준들의 비변성된 단백질을 가지는 캐놀라 오일 시드로부터 캐놀라 오일을 제거하여 생성된 임의의 캐놀라 밀이 될 수 있다. 캐놀라 오일 시드로부터의 캐놀라 오일의 제거는 일반적으로, 본 발명의 단백질 분리체의 회수과정에서 별개의 조작으로 수행된다.
- <19> 단백질용해화(protein solubilization)는, 식용 염용액을 사용하여 가장 효율적으로 달성될 수 있는데, 이는 염(salts)의 존재시 오일 시드 밀로부터 용해성 단백질의 제거가 향상되기 때문이다. 식용 염으로는, 염화칼륨과

같은 다른 염들도 사용될 수 있지만, 일반적으로 염화나트륨이 사용된다. 식용 염용액은, 상당량의 단백질의 용해화를 달성하기 위하여, 적어도 약 0.10, 바람직하게는 적어도 약 0.15의 이온세기를 가진다. 염용액의 이온세기가 증가함에 따라, 초기에 오일 시드 밀에서의 단백질의 용해화정도는 최고치에 다다를 때까지 증가한다. 이어지는 이온세기의 증가는 용해되는 총단백질을 증가시키지 않는다. 최고의 단백질용해화를 일으키는 식용 염용액의 이온세기는, 관련된 염 및 선택된 오일 시드 밀에 따라 다양하다.

- <20> 이온세기들이 증가함에 따라 단백질침전에 대하여 더 높은 정도의 희석이 요구되는 점을 고려할 때, 대개 약 0.8미만의 이온세기값을 이용하는 것이 바람직하고, 약 0.15 내지 약 0.6의 값이 보다 바람직하다.
- <21> 단백질의 염용해화(salt solubilization)는, 적어도 약 5℃, 바람직하게는 약 35℃까지의 온도에서, 바람직하게는 대개 약 10 내지 약 60분인 용해화시간을 단축시키기 위하여 교반(agitation)을 수반하여 수행된다. 최종적으로 높은 생성물수득율을 제공하기 위해서, 오일 시드 밀로부터 실질적으로 최대량의 단백질을 추출하기 위한 용해화를 수행하는 것이 바람직하다.
- <22> 약 5℃의 하한온도는 이 온도 이하에서는 용해화가 비실용적으로 느리게 일어나기 때문에 선택되는 것인 한편, 약 35℃의 바람직한 상한온도는 배치방식(batch mode)의 더 높은 온도수준들에서의 방법이 비경제적으로 될 수 있기 때문에 선택되는 것이다.
- <23> 수용성 식용 염 용액 및 오일 시드 밀은, 이하에서 보다 상세하게 설명되는 바와 같이, 단백질 분리체가 미셀루트(micellar route)로 형성될 수 있는 약 5 내지 약 6.8의 천연pH를 가진다. 단백질 분리체의 최대수득율을 위한 최적의 pH값은 선택되는 오일 시드 밀에 따라 다양하다.
- <24> pH범위의 한계값들 및 그 부근에서는, 단백질 분리체형성이 미셀루트를 통해서 일부만이 일어나고, 그 밖의 pH 범위 내에서 얻을 수 있는 것보다 낮은 수득율로 생성된다. 이러한 이유들로, 약 5.3 내지 약 6.2의 pH값들이 바람직하다.
- <25> 식용 염용액의 pH는, 추출단계에서 일반적으로 염산과 같은 임의의 간편한 식용산(food grade acid), 또는 수산화나트륨과 같은 식용알칼리(food grade alkali)를 사용하여, 약 5 내지 약 6.8 범위에서의 임의의 소망되는 값으로 조절될 수 있다.
- <26> 용해화단계시 식용 염용액에서의 오일 시드 밀의 농도는 광범위하게 변할 수 있다. 전형적인 농도값들은 약 5 내지 약 15w/v%이다.
- <27> 수용성염용액을 이용한 단백질추출단계는, 캐놀라 밀에 존재할 수 있는 지방들을 용해시키고 그 지방들이 수상에 존재하도록 하는 부가적인 효과를 가진다.
- <28> 추출단계를 거친 단백질 용액은, 일반적으로 약 5 내지 약 30g/L, 바람직하게는 약 10 내지 약 25g/L의 단백질 농도를 가진다.
- <29> 그 다음, 추출단계를 거친 수상(aqueous phase)은 진공여과법(vacuum filtration)과 같은 임의의 간편한 방법으로 잔여의 캐놀라 밀로부터 분리된 후, 원심분리 및/또는 여과에 의해 잔여의 밀(meal)을 제거한다. 분리된 잔여의 밀은 건조되어 폐기될 수 있다.
- <30> 최종 캐놀라 단백질 분리체의 색상은, 분리된 수용성 단백질 용액, 및 분말형 활성 탄소 또는 다른 색소 흡착제를 혼합한 후, 여과에 의해 간편하게 흡착제를 제거함으로써 밝은 색상 및 덜 진한 노랑으로 개선될 수 있다. 색소제거에는 분리된 수용성 단백질 용액의 투석여과(diafiltration)가 이용될 수도 있다.
- <31> 그러한 색소 제거 단계는, 임의의 간편한 조건들하에서, 일반적으로 분리된 수용성 단백질 용액의 대기온도에서 임의의 적합한 색소 흡착제를 사용함으로써 수행될 수 있다. 분말형 활성 탄소는, 약 0.025 내지 약 5w/v%, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 2w/v%의 양으로 사용된다.
- <32> Murray II 특허들에 서술된 바와 같이, 캐놀라 시드 밀이 상당량의 지방을 함유하는 경우, 분리된 수용성 단백질 용액 및 농축된 수용성 단백질 용액에 여기서 서술된 지방 제거 단계들(defatting steps)이 수행될 수 있다. 색상개선단계가 수행되는 경우, 그러한 단계는 제 1 지방 제거 단계 후에 수행될 수 있다.
- <33> 수용성 식용 염 용액으로 오일 시드 밀을 추출하는 대안으로서, 물(water)만을 이용하여 그러한 추출이 이루어질 수 있지만, 물만을 이용하는 경우에는 수용성 식용 염 용액을 이용하는 경우보다 오일 시드 밀로부터 단백질이 덜 추출되는 경향이 있다. 상기 대안이 이용되는 경우, 이하에서 서술되는 농축단계시 용액내에 단백질을 유지하기 위하여, 잔여의 오일 시드 밀로부터 분리 후 상술된 농도들의 식용 염이 단백질 용액에 첨가될 수 있다.

색상제거단계 및/또는 제 1 지방 제거 단계가 수행되는 경우, 일반적으로 그러한 단계들의 완료 후에 식용 염이 첨가된다.

- <34> 또 다른 대안으로는, 식용 염용액을 이용하여 약 6.8, 일반적으로 약 9.8까지의 비교적 높은 pH값에서 오일 시드 밀을 추출하는 것이다. 식용 염용액의 pH는, 수용성 수산화나트륨용액과 같은 임의의 간편한 식용알칼리를 사용하여 알칼리성 pH로 조정될 수 있다. 그러한 대안이 이용되는 경우, 오일 시드 밀의 추출단계를 거친 수상(aqueous phase)은 진공여과법을 사용하는 것과 같은 임의의 간편한 방법으로 잔여의 캐놀라 밀로부터 분리된 후, 원심분리 및/또는 여과법에 의해 잔여의 밀(meal)을 제거한다. 분리된 잔여의 밀은 건조하여 폐기할 수 있다.
- <35> 그 다음, 높은 pH에서의 추출단계를 거친 수용성 단백질 용액은, 이하에서 논의되는 추가공정 전에, 상술된 약 5 내지 약 6.8, 바람직하게는 약 5.3 내지 약 6.2 범위의 pH로 조절된다. 그러한 pH의 조절은 염산과 같은 임의의 간편한 식용산을 이용하여 수행될 수 있다.
- <36> 그 다음, 수용성 단백질 용액은, 실질적으로 일정한 이온세기를 유지하면서, 그것의 단백질 농도를 증가시키기 위하여 농축된다. 그러한 농축은 적어도 약 200g/L, 바람직하게는 적어도 약 250g/L의 단백질 농도를 가진 농축된 단백질 용액을 제공하도록 수행된다.
- <37> 농축단계는, 약 3000 내지 약 50,000달톤(daltons)과 같은 적합한 분자량컷오프(cut-off)를 가지는 공동섬유소 막들(hollow-fibre membranes) 또는 나선형막들(spiral-wound membranes)과 같은 막들을 막재료들 및 구성들을 다르게 고려하여 사용한, 예컨대 한외여과(ultrafiltration) 또는 투석여과(diafiltration)와 같은 임의의 간편한 선택성 막 기술(selective membrane technique)로 수행될 수 있다.
- <38> 농축단계는, 일반적으로 약 20℃ 내지 약 60℃의 임의의 간편한 온도에서 소망되는 정도의 농축이 달성되는 시간동안 수행될 수 있다. 사용되는 온도 및 다른 조건들은, 용액의 농도 및 소망되는 단백질 농도를 달성하는데 사용되는 막장치(membrane equipment)에 어느 정도 의존한다.
- <39> 이 단계에서, MurrayI 및 MurrayII방법들에서 사용될 때 얻어지는 이전의 수준들을 현저하게 초과하는, 약 200g/L을 초과하는 농도로의 단백질 용액의 농축은, 건단백질 분리체(dried protein isolate)로 회수된 추출단백질의 비율에 대하여 약 40 중량%를 초과하는, 바람직하게는 80 중량%를 초과하는 수준으로 수득물을 증가시킬 뿐만 아니라, 건조 후 최종단백질 분리체의 염농도를 감소시킨다. 분리체의 염농도를 조절하는 능력은, 특정식품의 응용물에서 염농도들의 변화가 기능적 및 감각적 특성들에 영향을 미치는 분리체의 응용들에 있어서 중요하다.
- <40> 널리 알려진 바와 같이, 한외여과 및 유사한 선택성 막 기술들은, 저분자량 종들(species)은 통과시키는 반면 고분자량 종들은 통과시키지 않는다. 저분자량 종들에는, 식용 염의 이온성 종들 뿐만 아니라, 탄수화물들(carbohydrates), 펩티드들(peptides), 색소들(pigments) 및 항-영양인자들(anti-nutritional factors)과 같은 원료에서 추출된 저분자량재료들 및 저분자량 형태의 단백질도 포함한다. 막의 분자량컷오프는, 다른 막재료들 및 구성들을 고려하여, 일반적으로 오염물들은 통과시키는 한편, 용액 중에 상당한 비율의 단백질을 확보할 수 있도록 선택된다.
- <41> 농축된 단백질 용액의 점도를 감소시켜 이어지는 회석단계의 수행 및 미셀 형성을 용이하게 하기 위하여, 농축단계에서 사용된 온도에 따라, 농축된 단백질 용액은 적어도 약 20℃ 내지 약 60℃, 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 40℃의 온도로 가온될 수 있다. 농축된 단백질 용액은, 찬물로 회석시 미셀 형성을 할 수 없는 이상의 온도를 초과하여 가열되어서는 안된다. 농축된 단백질 용액은, 필요하다면, MurrayII에 서술된 바와 같은, 추가적인 지방제거실시가 수행될 수도 있다.
- <42> 그 다음, 농축단계 및 선택적 지방 제거 단계를 거친 농축된 단백질 용액은, 소망되는 회석 정도를 얻기 위해 요구되는 분량의 물에 상기 농축된 단백질 용액을 첨가하여 회석됨으로써 미셀 형성이 된다. 미셀루트(micelle route)에 의해 얻어지는 것이 소망되는 캐놀라 단백질의 비율 및 상청액으로부터의 비율에 따라, 농축된 단백질 용액의 회석 정도는 변할 수 있다. 일반적으로, 회석수준이 높을수록, 수상에 더 많은 비율의 캐놀라 단백질이 남는다.
- <43> 미셀루트에 의해 최대비율의 단백질이 제공되기를 소망하는 경우, 농축된 단백질 용액은 약 15배 이하, 또는 바람직하게는 약 10배 이하로 회석된다.
- <44> 농축된 단백질 용액이 공급되어지는 물은, 단백질 미셀 덩어리 형태에서의 단백질 분리체의 수득물들은 사용된

회석인자들에서 더 낮은 온도들에서 개선되기 때문에, 약 15℃미만, 일반적으로 약 3℃ 내지 약 15℃, 바람직하게는 약 10℃미만의 온도를 가진다.

- <45> 농축된 단백질 용액의 회석 및 그에 따른 이온세기의 감소는, 미셀형태에서 분리된 단백질 방울들의 형태인, 고도로 회합된 단백질 분자들의 안개성덩어리(cloud-like mass)의 형성을 야기한다. 침전은, 원심분리와 같은 것으로 보조될 수 있다. 그렇게 유도된(induced) 침전은 단백질 미셀 덩어리에서의 액체함량을 감소시키고, 그에 따라 수분함량은 일반적으로 총 미셀 덩어리의 약 70 중량% 내지 약 95 중량%에서 약 50 중량% 내지 약 80 중량%으로 감소된다. 이러한 방법으로서의 미셀 덩어리의 수분함량의 감소는, 미셀 덩어리의 흡장된(occluded) 염함량, 즉 건조된 분리체의 염함량을 감소시킨다.
- <46> 적어도 약 200g/L의 단백질 함량으로의 단백질 용액의 농축 및 약 15 미만의 회석인자의 사용과 같은 공정변수들(process parameters)의 조합은, 원래의 밀추출물(meal extract)로부터 단백질 미셀 덩어리의 형태에서의 단백질의 회수에 대하여 더 높은 수득율들, 때때로 상당히 높은 수득율들, 및 단백질 함량에 대하여 상기에서 언급된 임의의 종래기술방법들(MurrayIA, IB 및 II)을 사용하여 얻어지는 것보다 더 정제된 분리체들을 제공한다.
- <47> "단백질 미셀 덩어리(protein micellar mass)" 또는 PMM이라 일컫는, 비정형이고 회합되고 끈끈하고 젤라틴성인 글루텐성 단백질덩어리 형태의 침전분리체는, 침전덩어리로부터 잔여의 수상을 기울여 버리는 것(decantation)에 의해 또는 원심분리(centrifugation)에 의해 잔여의 수상 또는 상청액으로부터 분리된다. PMM은 습식형으로 사용될 수도 있고, 또는 분사건조, 냉동건조 또는 진공드럼건조(vacuum drum drying)와 같은 임의의 간편한 기술에 의한 건조형일 수도 있다. 건조형PMM은 약 100 중량%(Kjeldahl Nx6.25로 측정됨)의 단백질을 초과하는 높은 단백질 함량을 가지며, 실질적으로 비변성된다(시차주사열량계로 측정됨). 지방성오일 시드 밀(fatty oil seed meal)로부터 분리된 건조형PMM도, MurrayII의 방법이 사용되는 경우, 약 1 중량% 미만이 될 수 있는 낮은 잔여지방 함량을 가진다.
- <48> 본 발명의 제 1 측면에 따르면, 특히 캐놀라 단백질에 적용된 경우, PMM 형성 및 침전 단계에서의 상청액은 회석단계에서 침전되지 않은 상당한 양의 캐놀라 단백질을 포함하는 것을 알아냈다. 상청액으로부터 추가단백질을 회수하는 시도는, MurrayIA, IB 및 II특허들에서 이전에 제안되지 않은 것이며, 상청액의 소정의 잠재적인 단백질 함량에 관하여 상기 종래기술에서는 암시되지 않은 것이다. 본 발명의 상기 측면에 따르면, 상청액으로부터 캐놀라 단백질을 회수하는 단계들이 고려된다.
- <49> 그러한 방법에서, 회석단계 후 PMM을 제거한 상청액은 그것의 단백질 농도를 증가시키기 위하여 농축될 수 있다. 그러한 농축은, 용액 내에 캐놀라 단백질을 유지하면서, 식용 염 및 원료로부터 추출된 기타 비-단백질성 저분자량물질들을 포함한 저분자량 종들을 통과시키는데 적합한 분자량컷오프를 가진 막들을 사용한 한외여과와 같은 임의의 간편한 선택성 막 기술을 이용하여 수행된다. 다른 막들 및 구성들을 가지는 약 3000 내지 10,000 돌턴의 분자량컷오프의 한외여과막들이 사용될 수 있다. 이러한 방법으로서의 상청액의 농축은 또한, 액체부피를 감소시켜 건조시 요구되는 에너지를 감소시킨다. 상청액은 일반적으로 약 100 내지 400g/L, 바람직하게는 약 200 내지 약 300g/L의 단백질 함량으로 농축된 후, 건조된다.
- <50> 농축된 상청액은, 분사건조, 냉동건조 또는 진공드럼건조와 같은 임의의 간편한 기술에 의해 건조되어 건조형의 추가의 캐놀라 단백질 분리체를 제공할 수 있다. 그러한 추가적인 캐놀라 단백질 분리체는 일반적으로 약 90 중량%를 초과하는 높은 단백질 함량을 가지며(Kjeldahl Nx6.25로 측정), 실질적으로 비변성된다(시차주사열량계로 측정됨). 소망된다면, 습식형PMM은 농축된 상청액과 조합된 후, 그 조합된 단백질분류(stream)를 임의의 간편한 기술로 건조함으로써 조합된 캐놀라 단백질 분리체를 제공할 수 있다. 조합된 캐놀라 단백질 분리체는, 약 90 중량%를 초과하는 높은 단백질 함량을 가지며(Kjeldahl Nx6.25로 측정), 실질적으로 비변성된다(시차주사열량계로 측정됨).
- <51> 다른 대안으로, 농축된 상청액의 일부만이 PMM의 적어도 일부와 혼합되고, 그 혼합물은 건조될 수 있다. 농축된 상청액의 잔여분은 PMM의 임의의 잔여분으로서 건조될 수 있다. 또한, 건조된 PMM 및 건조된 상청액도 임의의 소망되는 상대비율들로 혼합될 수 있다.
- <52> 이 방법으로 조작함으로써, 다량의 캐놀라 단백질 분리체들이, 건조형PMM, 건조형상청액, 및 다른 기능적/영양적 특성들을 얻는데 바람직한 것으로 일반적으로 약 5:95 중량% 내지 약 95:5 중량%인 다양한 중량%의 PMM 및 상청액의 건조형혼합물들의 형태로 회수될 수 있다.
- <53> 농축된 단백질 용액의 잔물에서의 회석 및 상술된 침전물 및 상청액의 처리에 대한 대안으로서, 단백질은 그것의 염함량을 감소시키기 위하여 농축된 단백질을 투석함으로써 농축된 단백질 용액으로부터 회수될 수 있다

다. 농축된 단백질 용액에서의 염함량의 감소는 투석배관(dialysis tubing)에서 단백질 미셀들의 형성을 초래한다. 투석 후, 단백질 미셀들은, 상술된 바와 같이, 침전, 수집 및 건조될 수 있다. 단백질 미셀침전 단계에서의 상청액은 상술된 바와 같이 처리되어 추가적인 단백질을 회수할 수 있다. 또는, 투석배관의 내용물들은 직접 건조될 수 있다. 후자의 대안방법은 소실험실규모의 단백질량이 소망되는 경우 유용하다.

실시예

<55> 도 1은 본 발명의 하나의 실시예의 개략적인 흐름도를 보여준다. 캐놀라 오일 시드 밀 및 수용성추출매질(medium)은 라인(10)에 의해 추출용기(12)로 공급되고, 여기서 오일 시드 밀은 추출되어 수용성 단백질 용액이 형성된다. 수용성 단백질 용액의 슬러리(slurry) 및 잔여의 오일 시드 밀은 라인(14)을 통과하여 진공여과벨트(16)로 공급되고, 라인(18)에 의해 제거된 잔여의 오일 시드 밀은 분리된다. 그 다음, 수용성 단백질 용액은 라인(20)을 통과하여 정화작업소(22)로 공급되고, 여기서 수용성 단백질 용액은 라인(24)에 의해 회수되는 미분들(fines)을 제거하기 위하여 원심분리되어 여과된다.

<56> 정화된 수용성 단백질 용액은 라인(26)에 의해 한외여과막(ultrafiltration membrane, 28)을 통해 펌핑되고, 라인(30)에서 농축액(retentate)인 농축된 단백질을 생성하고 라인(32)에 의해 투과액(permeate)이 회수된다. 농축된 단백질 용액은, 라인(36)으로 공급된 찬물을 포함하는 침전용기(34) 내로 통과된다. 침전용기(34)에 형성된 단백질 미셀 덩어리는 라인(38)에 의해 제거되고 분사건조기(4)를 통과하여 건조형캐놀라 단백질 분리체(dry canola protein isolate, 42)를 제공한다.

<57> 침전용기(34)에서의 상청액은 라인(44)에 의해 제거되어 한외여과막들(46)을 통하여 펌핑됨으로써, 라인(50)에 의해 제거되는 투과액(permeate)과 함께, 라인(48)에서 농축액(retentate)으로서 농축된 단백질을 생성한다. 농축된 단백질 용액은 분사건조기(52)를 통과하여 추가의 건조형캐놀라 단백질 분리체(dry canola protein isolate, 54)를 제공한다.

<58> 다른 방안으로, 라인(48)에서 농축된 단백질 용액은 라인(56)으로 통과된 단백질 미셀 덩어리와 혼합되고, 그 혼합물은 분사건조기(40)에서 건조될 수 있다.

<59> 실시예들

<60> 실시예 1

<61> 본 실시예는 본 발명의 공정을 설명한다.

<62> 대기온도에서 0.15M NaCl용액 'b' L에 시판용 캐놀라 밀 'a' kg을 첨가한 후 30분간 교반하여, 'c' g/L의 단백질 함량을 가진 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트(vacuum filter belt)에서 세척하였다. 그 단백질 용액을 원심분리로 정화하여, 'e' g/L의 단백질 함량을 가진 정화된 단백질 용액 'd' L가 생성되었다.

<63> 단백질추출용액 또는 'f' L의 단백질추출용액의 분취량(aliquot)을, 'h' 돌턴의 분자량컷오프(cut-off)를 가진 막들을 사용한 한외여과계에서 농축함으로써, 부피를 'g' L까지 감소시켰다. 그 농축된 단백질 용액은 'i' g/L의 단백질 함량을 가졌다.

<64> 'j' °C에서 농축된 용액을 4°C 물에서 'k' 비율로 희석하였다. 단백질 미셀들의 백색뿌연(white cloud)이 즉시 형성되고, 침전되도록 방치하였다. 상층희석수를 제거하였고, 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 'l' 중량%의 추출단백질의 수득물로 용기의 바닥에서 제거하여 건조하였다. 건조된 단백질은 'm' 중량%(Nx 6.25)의 단백질 함량을 가지는 것으로 확인되었다. 생성물은 'n'으로 표시되었다. 변수들 'a' 내지 'n'은 다음의 표 1에서 약술되었다.

표 1

n	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
CPIA06-13	300	2500	13.0	1160	10.5	(1)	13	30000	303	(2)	1:10	(2)	106.5
BW-AH12-G16-01	225	1500	19.6	(2)	17.5	600	30	3000	245	30	1:15	(2)	104.1
BW-AL016-K15-01(3)	1200	8000	14.9	(2)	10.4	400	40	10000	257	30	1:15	46	106.9
CPI-A06-33	300	2000	10.8	1800	8.7	(1)	55	30000	217	(2)	1:10	(2)	104.3
AI1-04	300	2000	23.2	1772	21.7	1000	52	30000	240	34	1:15	(2)	107.2

<66> 참조 : (1) 모든 단백질추출용액은 농축되었음

<67> (2) 측정되지 않음

<68> (3) 회석 전 40L의 부피를 유지하면서 농축액은 6배의 0.15M NaCl로 투석여 과되
었음.

<69> 실시예 2

<70> 실시예 1 방법은, 변경된 공정조건들로 반복되었다. 많은 변수들이 연구되었다.

<71> (a) 추출변수들(Extraction parameters):

<72> 얻어진 단백질 용액의 농도에 대한 추출변수들의 영향을 확인하기 위하여, 추출변수들을 변화시켰다. 그 결과들은 다음의 표 2에 작성되었다:

표 2

추출농도	추출온도	추출시간	NaCl용액의 농도	추출용액의 pH	단백질 농도
5w/v%	13℃	30분	0.15M	6.4	5.3g/L
15w/v%	13℃	30분	0.15M	6.2	12.7g/L
15w/v%	8℃	30분	0.15M	-	6.6g/L
15w/v%	34℃	30분	0.15M	-	14.6g/L
15w/v%	22℃	10분	0.15M	5.9	10.5g/L
15w/v%	13℃	60분	0.15M	5.9	10.6g/L
10w/v%	15℃	30분	0.15M	-	9.7g/L
10w/v%	13℃	70분	0.15M	-	9.3g/L
10w/v%	13℃	30분	0.15M	5.3	9.8g/L
10w/v%	13℃	30분	0.15M	6.2	10.6g/L

<74> (b) 회석변수들(Dilution parameters):

<75> 회석단계에서의 PMM의 수득율에 대한 회석변수들의 영향을 확인하기 위하여, 회석변수들을 변화시켰다. 그 결과들은 다음의 표 3에 작성되었다:

표 3

단백질 농도	회석수 온도	회석비	PMM회수
206g/L	4℃	1:10	51.7%
258g/L	4℃	1:10	61.8%
283g/L	4℃	1:10	42.6%
230g/L	15℃	1:10	4.5%
249g/L	4℃	1:5	40.4%
249g/L	4℃	1:3	30.7%

<77> 실시예 3

<78> 본 실시예에서는, 단백질 분리체 생성물의 수득율에 대한 회석수 온도의 영향을 설명한다.

<79> 8000L의 0.15M NaCl용액에 시판용 캐놀라 밀 1200kg를 첨가한 후 30분간 교반하여, 17.4g/L의 단백질 함량을 가진 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에서 세척하였다. 그 단백질 용액을 원심분리에 의해 정화하여, 14.8g/L의 단백질 함량을 가지는 정화된 단백질 용액 7464L가 생성되었다.

<80> 단백질추출용액을 3000돌턴의 막들을 이용한 한외여과계에서 농축함으로써 부피가 감소되었다. 그 농축된 단백질 용액은 230g/L의 단백질 함량을 가졌다.

<81> 50ml의 농축용액을 30℃까지 가온한 후, 15℃의 수돗물 내에서 1:10으로 회석시켰다. 극소미셀들의 약간 백색뿐

염이 형성되었고 침전시키기 위하여 방치하였다. 상층회석수를 제거하여 극미량의 침전물만 남겼다. 침전물은, 4℃의 수돗물에서 회석되는 경우 얻어지는 전형적인 50 중량%의 회수량 대신에, 농축용액의 50ml분취량(aliquot)에서 4.5 중량%의 단백질만을 나타내었다. 50ml의 분류는 BW-AH012-H14-01A인 배치(batch)로부터 가져왔다. 이 실시예의 자료는 회석비에 대하여 상기 표 3에 열거되어 있다.

실시예 4

본 실시예에서는 회석수득율에 대한 농축용액의 온도의 영향을 보여준다.

대기온도에서 8000L의 0.15M NaCl용액에 시판용 캐놀라 밀 1200kg를 첨가한 후 13℃에서 30분간 교반하여, 'a'g/L의 단백질 함량을 가진 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에 서 세척하였다. 그 단백질 용액을 원심분리에 의해 정화하여, 'b'g/L의 단백질 함량을 가지는 정화된 용액이 생성되었다.

정화된 단백질 용액 또는 단백질추출용액의 'c'분취량(aliquot)은, 'e'돌턴의 분자량컷오프를 가진 막을 이용한 한외여과계에서 부피를 'd'까지 감소시켰다. 그 농축 단백질 용액은 'f'g/L의 단백질 함량을 가졌다.

변수 'a' 내지 'g'는 다음의 표 4에 주어진다.

표 4

g	BW-AL011-J16-01A	BW-AL-17-D11-02A
a	244	263
b	203	18.0
c	(1)	2000
d		152
e	3000	5000
f	287	2859

참조:(1)모든 단백질추출용액은 농축됨.

BW-AL011-J16-01A의 50ml 농축액분류들(retentate aliquots)을 30℃ 및 60℃까지 가온한 후, 4℃의 물에서 1:10으로 회석시켰다. 각 경우에서, 백색의 뿌연 단백질 미셀들이 즉시 형성되었고, 침전되도록 방치하였다. 상층회석수를 제거하고, 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 건조시켰다. 각각의 실험들로부터 PMM을 회수하여, 회석단계의 수득율을 계산하였다. 농축온도가 30℃인 경우의 단백질회수율이 57.1 중량%인 반면, 60℃인 경우의 수득율은 23.7 중량%였다.

BW-AL017-D11-02A의 50ml 농축물분류들(retentate aliquots)을 30℃와 60℃사이의 다양한 온도들로 가온한 후, 4℃의 물에서 1:10 또는 1:15로 회석시켰다. 각 경우들에서, 백색의 뿌연 단백질 미셀들이 즉시 형성되었고 침전되도록 방치하였다. 상층회석수를 제거하고, 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 건조시켰다. 각각의 실험들로부터 PMM을 회수하여 회석단계에서의 수득율을 계산하였다. 얻어진 결과들은 다음의 표 5에서 보여준다:

표 5

농축액 온도	회석비	PMM 수득율
30℃	1:10	49%
40℃	1:10	49%
50℃	1:10	47%
60℃	1:10	35%
30℃	1:15	51%
40℃	1:15	51%
50℃	1:15	39%
60℃	1:15	39%

상기 표에서 보는 바와 같이, 완만하게 상승된 온도들에서 더 높은 수득율들이 얻어지는 반면, 높게 상승된 온도들에서는 수득율이 감소하는 경향이 있다.

실시예 5

- <93> 본 실시예는 다양한 변수들의 조합들을 사용하고, 부가적으로 분말형활성화탄소로의 처리를 포함한 추가적인 캐놀라 단백질 분리체들의 제조를 설명한다.
- <94> 대기온도에서 'b' L의 0.15M NaCl 용액에 'a' kg의 시판용 캐놀라 밀을 첨가한 후 'c' 분간 교반하여, 'd' g/L의 단백질 함량을 가진 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에서 세척하였다. 그 단백질 용액을 원심분리에 의해 정화하여, 'e' g/L의 단백질 함량을 가지는 정화된 단백질 용액이 생성되었다.
- <95> 상기 정화된 용액에 분말형활성화탄소(PAC) 'f' 중량%를 첨가하였다. 약 15분간 현탁액을 혼합한 후, 여과를 통하여 PAC를 제거하여 'h' g/L의 추출액 'g' L가 생성되었다.
- <96> PAC처리단계에서 단백질추출용액의 분류 'i' L를 30,000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막을 이용한 한외여과계에서 'j' L까지 부피를 감소시켰다. 그 농축 단백질 용액은 'k' g/L의 단백질 함량을 가졌다.
- <97> '1' °C에서 농축된 용액을 4°C의 수돗물에서 1: 'm' 으로 희석시켰다. 백색뿌임이 즉시 형성되고 침전되도록 방지하였다. 상층희석수를 제거하고, 침전된 점성의 끈끈한 덩어리를 건조시켰다. 형성된 건단백질은 'n' 중량%(Nx 6.25 d.b)의 단백질 함량을 가졌다. 최종적인 단백질회수, 즉 추출단계에서 용해된 단백질의 퍼센트에 대하여 표현된 건단백질 분리체의 평균은 'o' 중량%였다. 생성물은 'p'로 표시되었다.
- <98> 단백질생성물의 다른 샘플들에 대한 특정변수들 'a' 내지 'p'는 다음의 표 6에서 설명된다.

표 6

p	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m	n	o
A07-15	150	1000	30	14.0	13.1	2	700	8.9	460	21	246	30	10	103.5	44
A07-15	150	1000	120	13.0	12.3	4	800	8.2	800	9	490	20	5	106.9	(1)
A08-02	300	2000	300	14.0	14.5	0.06	1300	13.8	480	6	421	25	5	105.8	(1)
A10-13	300	2000	45	28.6	24.9	1	2150	22.7	1000	80	176	20	10	109.2	(1)

<101> 참조:(1) 측정되지 않음.

<102> 캐놀라 단백질 분리체의 색상에 대한 분말형 활성 탄소 첨가의 효과는 이하의 실시예 7에서 보여진다.

실시예 6

- <104> 본 실시예는, 추출단계에서 물을 사용하고 이어서 염을 첨가하는 본 발명의 실시예를 설명한다.
- <105> 13°C에서 1000L의 물에 시판용 캐놀라 밀 150kg을 첨가한 후 30분간 교반하여, 4.5g/L농도의 단백질 용액이 생성되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에서 세척하였다. 그 단백질 용액을 원심분리로 정화하여 3.8g/L추출액 1100L가 생성되었다.
- <106> 여과패드들 상에 분말형 활성 탄소(PAC)를 예비코팅한 후, 정화된 용액을 여과하여 3.2g/L 추출액 1000L이 생성되었다.
- <107> 후자의 단백질 용액에 0.15M의 농도로 염화나트륨을 첨가하였다. 약 30,000돌턴의 막들을 사용한 한외여과계에서 단백질 용액의 부피를 10L로 감소시켰다. 농축용액은 292g/L의 단백질 함량을 가졌다. 농축된 단백질 용액의 분취량(aliquot)을 30°C로 가온한 후 4°C의 물에서 1:3으로 희석시킨다.
- <108> 백색뿌임이 즉시 형성되었고 침전되도록 방지하였다. 상층희석수를 제거하고, 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 건조시켰다. CPI A07-18로 확인된, 건조된 캐놀라 단백질 분리체는 96 중량%의 단백질 함량을 가졌다. 단백질의 회수량은 원(original)추출단백질의 59 중량%였다.

실시예 7

<110> 본 실시예는, 분사건조된 달걀흰자, 종래의 콩단백질 분리체 및 Murray II에 따라 생성된 생성물들과 비교하여,

여기서 생성된 소정의 캐놀라 단백질 분리체의 색상의 비교를 보여준다.

<111> 단백질 분리체의 샘플들은 미놀타색채계(Minolta colourimeter)를 사용하여 밝기(lightness, L) 및 색도(chromaticity, a 및 b)에 대하여 평가되었다. L, a, b색상공간에서, 수치는 0 내지 100까지 이동하며, 100은 백색이고 0은 흑색이다. 색도는, a 및 b로, 둘 다 +60 및 -60의 최대값들을 가지며, +a는 적색방향, -a는 녹색방향, +b는 황색방향 및 -b는 청색방향으로 배워한다.

<112> 다음의 표 7은 얻어진 결과를 설명한다.

표 7

<113>

샘플	L	a	b	비고
달걀흰자	90.34	-2.73	21.43	
콩단백질 분리체	85.10	-0.906	14.67	a 및 b값들은 CP I처리된 PAC보다 달걀흰자에 가깝지 않음
CPI A07-15 (실시에 5)	82.77	-2.13	22.98	고PAC로 NaCl추출
CPI A07-18 (실시에 6)	82.80	-2.69	25.19	PAC로 물추출
CPI A06-33 (실시에 1)	75.60	0.404	26.51	무PAC로 NaCl추출
CPI A08-02 (실시에 5)	80.04	-2.87	23.37	저PAC(0.06%)로 NaCl추출
Murray II	65.81	0.962	18.27	비교적어두운 생성물

<114> 표 7에서 설명된 결과들은, 분말형 활성 탄소의 사용에 의한 색상들에 대한 효과, 즉 백색이 많을수록, 황색이 적을수록 유리한 효과를 나타낸다는 것을 보여준다.

<115> 실시예 8

<116> 본 실시예는, 상청액으로부터 회수된 단백질을 포함한, 추가적인 캐놀라 단백질 분리체의 제조를 설명한다.

<117> 대기온도에서 'b'L의 0.15M NaCl용액에 시관용 캐놀라 밀 'a'kg를 첨가한 후 30분간 교반하여, 'c'g/L의 단백질 함량을 가지는 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에서 세척하였다. 그 단백질 용액을 원심분리에 의해 정화하여 'd'g/L의 단백질 함량을 가지는 정화된 단백질 용액이 생성되었고, 이어서 1 중량%의 분말형 활성 탄소(PAC)를 첨가하였다.

<118> 현탁액을 15분동안 혼합한 후, 여과에 의해 PAC를 제거하여 'f'g/L추출물 'e'L를 얻었다.

<119> 30,000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막을 이용한 한외여과계에서, PAC처리단계에서의 단백질추출용액의 분취량(aliquot) 'g'L를 'h'L까지 부피를 감소시켰다. 결과농축 단백질 용액은 'i'g/L의 단백질 함량을 가졌다.

<120> 'j'℃에서 농축된 용액을 4℃의 물에서 1:'k'로 희석시켰다. 백색뿌임이 즉시 형성되고 침전되도록 방치하였다. 상층희석수를 제거하였고, 3000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 이용한 한외여과에 의해 부피감소인자 'l'로 감소시켰다. 침전된 점성의 끈끈한 덩어리에 농축액을 첨가하고, 그 혼합물을 건조시켰다. 형성된 건단백질혼합물은 'm' 중량%(Nx 6.25)의 단백질 함량을 가졌다. 생성물은 CPI'n'으로 표시되었다.

<121> 두 개의 다른 단백질생성물의 샘플들에 대한 특정변수들 'a' 내지 'n'은 다음의 표 8에서 설명된다.

표 8

<122>

n	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	l	m
A10-04	300	2000	28.4	27.6	1330	16.3	200	18	186	28	10	11	100.3
A10-05	300	2000	27.7	21.9	1320	21.9	300	20	267	27	15	21	102.3

실시예 9

- 본 실시예는, PAC처리없이, 상층액으로부터 회수된 단백질을 포함한 추가적인 캐놀라 단백질 분리체의 제조를 설명한다.
- 20℃에서 'b' L의 0.15M NaCl 용액에 시판용 캐놀라 밀 'a' kg를 첨가한 후 30분간 교반하여, 'c' g/L의 단백질 함량을 가지는 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에서 세척하였다. 그 단백질 용액을 원심분리에 의해 정화하여 'd' g/L의 단백질 함량을 가지는 정화된 단백질 용액이 생성되었다.
- 'f' 돌턴의 분자량컷오프를 가진 막을 사용한 한외여과계에서, 단백질추출용액 또는 단백질추출용액의 분취량(aliquot) 'e' L의 부피를 감소시켰다. 그 농축 단백질 용액은 'g' g/L의 단백질을 가졌다.
- 'h' ℃에서 농축된 용액을 'j' ℃의 물에서 'k' 배로 희석시켰다. 백색뿌임이 즉시 형성되고 침전되도록 방지하였다. 상층희석수를 제거하고, 3000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 이용한 한외여과에 의해 농축시켜, 'k' g/L의 단백질 함량을 가진 농축된 상층액이 제공되었다. 침전된 점성의 끈끈한 덩어리에 농축액을 첨가하고, 그 혼합물을 건조시켰다.
- 건조된 단백질혼합물은 'l' 중량%(Nx 6.25)의 단백질을 가지는 것으로 확인되었다. 단백질 용액추출물로부터의 캐놀라 단백질 분리체의 수득율은 'm' 중량%이었다. 생성물은 'n' 으로 표시된다.
- 두 개의 다른 단백질생성물의 샘플들에 대한 특정변수들 'a' 내지 'n'은 다음의 표 9에서 설명된다.

표 9

n	BW-AL11-I21-01A	A11-01
a	1200	300
b	8000	2000
c	24.5	23.7
d	17.8	20.7
e	(1)	400
f	3000	30,000
g	284.7	200.2
h	31	32
i	1:10	1:15
j	8	4
k	279.0	104.7
l	100.2	102.8
m	68.1	(2)

- 참조: (1) 모든 단백질추출용액은 농축됨
- (2) 측정되지 않음

실시예 10

- 본 실시예는 비교적 높은 pH에서의 캐놀라 단백질가루의 추출 및 상층액으로부터의 단백질의 회수를 설명한다.
- 대기온도에서 수산화나트륨의 첨가로 pH 9.5로 조절된 0.15M NaCl 용액 2000L에 시판용 캐놀라 밀 150kg를 첨가한 후 30분간 교반하여, 13.2g/L의 단백질 함량을 가지는 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 원심분리 및 여과에 의해 정화하여 12.1g/L의 단백질을 가지는 정화된 단백질 용액 1210L가 생성되었다.
- 정화된 단백질 용액의 pH는 염산의 첨가로 6.2로 조절되었다. 900L의 단백질추출액 분취량(aliquot)은 3000돌턴의 분자량컷오프를 가지는 막들을 이용한 한외여과계에서 농축에 의해 50L로 부피감소하였다. 농축 단백질 용액은 276g/L의 단백질을 가졌다.
- 30℃에서 농축된 용액을 4℃의 물에서 1:15로 희석시켰다. 백색뿌임이 즉시 형성되고 침전을 위해 방지하였다. 상층희석수를 제거하고, 3000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 이용한 한외여과에 의해 농축시켜, 390L의 상

청액을 24L까지 농축시켜 149.0g/L의 단백질 함량을 가진 농축된 상청액이 제공되었다. 침전된 점성의 끈끈한 덩어리에 농축액을 첨가하고, 그 혼합물을 건조시켰다.

<138> 건조된 단백질혼합물은 103.3 중량%(Nx 6.25)의 단백질 함량을 가지는 것으로 확인되었다. 단백질 용액추출물로부터의 캐놀라 단백질 분리체의 수득율은 48.3 중량%였다. 생성물은 BW-AL017-D08-02A로 표시된다.

<139> 실시예 11

<140> 본 실시예는 상청액의 처리에 의한 캐놀라 단백질 분리체의 제조를 설명한다.

<141> 대기온도에서 'b' L의 0.15M NaCl 용액에 시판용 캐놀라 밀 'a' kg를 첨가한 후 30분간 교반하여, 'c' g/L의 단백질 함량을 가지는 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에서 세척하였다. 단백질 용액을 원심분리에 의해 정화하여 'd' g/L의 단백질 함량을 가지는 정화된 단백질 용액이 생성되었다.

<142> 3000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막을 이용한 한외여과계에서, 정화된 단백질 용액의 부피를 감소시켰다. 농축 단백질 용액은 'e' g/L의 단백질 함량을 가졌다.

<143> 'f' °C에서 농축된 용액을 4°C의 물에서 'g' 배로 희석시켰다. 백색뿌임이 즉시 형성되고 침전을 위해 방치하였다. 상층희석수를 제거하고, 용기의 바닥으로부터 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 회수하여 건조시켰다. 건조된 단백질은 'k' 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가지는 것으로 확인되었다.

<144> 제거된 상층희석수는, 3,000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 사용한 한외여과에 의해 부피를 감소시켜 'i' g/L의 단백질 농도로 되었다. 그 다음 농축액을 건조시킨다. 건조된 단백질은 'j' 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가졌다. 생성물은 'l'로 표시하였다.

<145> 두 개의 다른 단백질생성물의 샘플들에 대한 특정변수들 'a' 내지 'l'은 다음의 표 10에서 설명된다.

표 10

	l	AL016-J24	AL011-J16-01A
<146>	a	1200	1200
	b	8000	8000
	c	22.7	24.4
	d	16.9	20.3
	e	281	287
	f	37	28
	g	1:10	1:10
	h	(2)	101.9
	i	(3)	265
	j	103.9	101.5
	k	(2)	101.6

<147> 참조 : (1) 모든 단백질추출액은 농축됨

<148> (2) 측정되지 않음

<149> (3) 상청액은 부피감소인자 16으로 농축됨

<150> 실시예 12

<151> 본 실시예는, 냉압 캐놀라 밀(cold pressed canola meal) 및 상청액으로부터의 추가적인 단백질의 회수에 대한 본 발명의 응용을 설명한다.

<152> 50kg의 캐놀라 밀을 가압하여 오일 13L를 회수하였다. 20°C에서, 분쇄된 밀 30kg을 300L의 0.15M NaCl에 첨가하고, 그 혼합물을 40분간 교반한 후, 침전되도록 30분간 방치하였다. 19.5mg/mL의 단백질 함량을 가진 수용성 단백질 용액 200L가 얻어졌다.

<153> 수용성 단백질 용액을 4°C로 냉각하고 그 온도에서 16시간동안 냉장한 후, Murray II 방법에 따라 밀에 존재하는 지방 및 추출단계에서 추출된 지방을 분리하였다. 수용성 단백질 용액의 표면으로부터 상기 지방층을 제거하였다. 잔여의 수용성 단백질 용액을 20μm의 여과패드를 가진 가압여과기를 통해 여과하여, 지방의 잔여입자들 뿐

만 아니라 남아있는 깍지입자들 및 세포벽물질을 제거한다. 14.6mg/ml의 단백질 함량을 가진 여과액 200L가 얻어졌다.

<154> 10,000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 이용한 한외여과계에서의 농축에 의해, 수용성 단백질 용액의 부피를 10.5L로 감소시켰다. 그 농축된 단백질 용액은 200g/L의 단백질 함량을 가지며, 이는 캐놀라 밀로부터 추출된 원단백질의 67 중량%의 수득물로 표현된다. 상기 10.5L용액을 다시 4℃로 냉각한 후 16시간동안 그 온도에서 냉각하였다. 그 다음, 상기 용액을 10,000xg에서 5시간동안 원심분리하고, 분리된 지방을 농축된 단백질 용액으로부터 제거하였다.

<155> 단백질 용액을 30℃로 가온한 후, 4℃의 물을 1:9의 희석비가 되도록 첨가하였다. 밤새 침전시킨 후, 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM) 약 9L를 남기고, 상청액 85L는 따라버렸다. PMM을 10000xg에서 5분간 원심분리로 농축하고, 그 농축된 PMM의 분취량(aliquot)을 냉동건조하여 단백질 함량을 측정하였다. 냉동건조된 PMM은 105.5 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가지는 것으로 확인되었다.

<156> PMM 형성단계에서의 상청액을, 10,000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 이용한 한외여과계에서의 농축에 의해, 11L로 농축시켰다. 이 후자의 농축용액은 89.7mg/ml의 단백질 농도를 가졌다. 이 농축용액의 분류를 냉동건조하여 단백질 함량을 측정하였다. 냉동건조된 단백질은 101.7 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가지는 것으로 확인되었다.

<157> PMM 및 캐놀라밀로부터 추출된 단백질로부터의 상청액으로부터 회수된 단백질의 최종수득율은 50 중량%였다.

<158> 실시예 13

<159> 본 실시예는 높은 에루크산(erucic acid) 유채종자(rape seed)에 대한 본 발명의 응용을 설명한다.

<160> 15℃에서, 0.3M NaCl용액 350L에 시판용 에루크산 35kg를 첨가한 후 1시간동안 교반하여, 7.71g/L의 단백질 함량을 가지는 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 동일조건들하에서의 2차시행에서는 7.36g/L의 단백질 함량을 가진 수용성 단백질 용액이 생성되었다. 추출용액들은 따라버리고, 잔여의 밀을 제거하기 위하여 20μm여과패드들을 통과하는 여과에 의해 정화함으로써 총여과액 550L가 제공되었다.

<161> 그 다음, 여과액을, 10,000돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 가진 공동섬유소한외여과계(hollow fibre ultrafiltration)를 이용하여 9L로 농축시켰다. 농축된 단백질 용액은 232g/L의 단백질 함량을 가졌다.

<162> 그 다음, 30℃에서, 상기 농축된 단백질 용액을 4℃의 물에서 1:9의 비율로 희석시켰다. 백색뿌임이 즉시 형성되었고, 침전되도록 4℃에서 16시간동안 방치하였다. 80L의 상청액은 따라버리고, 투석여과농축에 의해 47.7g/L의 단백질 함량을 가지는 7L의 농축상청액으로 부피감소시켰다.

<163> 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 모아서 냉동건조하였다. 1L의 농축된 상청액이 냉동건조되었다. 106 중량%의 단백질 함량을 가지는 공정으로부터 냉동건조된 PMM 1393g이 얻어졌다. 1L의 냉동건조된 농축상청액에서 67g이 수득되었으므로, 7L의 농축상청액은 469g의 건단백질이 포함되고, 따라서 오일 시드 밀로부터 추출된 단백질로부터의 총단백질 수득율은 47 중량%이다. 냉동건조된 농축상청액은 83 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가지므로, PMM 및 농축상청액으로부터의 단백질은 건중량에 대하여 102 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가진다.

<164> 실시예 14

<165> 본 실시예는 겨자종자에 대한 본 발명의 응용을 설명한다.

<166> 20℃에서, 0.15M NaCl용액 750ml에 시판용 겨자종자 밀 75g을 첨가한 후 30분간 교반하였다. 10,000xg에서 10분간 추출슬러리를 원심분리하여 추출단백질로부터 쓸모없는(spent) 밀을 분리하였다. 그 다음, 추가적인 정화를 위해서, 18.05mg/ml의 단백질 함량을 가지는 500ml의 단백질 용액을 와트만여과지 #4(Whatman filters #4)를 통과하여 여과시켰다.

<167> 정화된 용액을, 10,000분자량컷오프의 막들을 이용한 밀리포어 소형한외여과교반세포계(millipore miniultrafiltration stirred cell system)에서 27ml로 농축시킨다. 농축된 단백질 용액은 218g/L의 단백질 농도를 가졌다.

<168> 30℃에서, 농축된 단백질 용액 27ml 중 22.2ml를 4℃의 수돗물에서 1:9의 비율로 희석시켰다. 백색뿌임이 즉시 형성되고, 침전을 위해 4℃에서 16시간동안 방치하였다. 상청액 200ml는 따라버렸다.

<169> 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 모아 10,000xg에서 5분간 원심분리하여 펠렛의 습도를 감소시킨 후, 냉동

건조하였다. 4.48g의 냉동건조된 펠릿이 얻어졌고, 이는 오일 시드 밀로부터 추출된 단백질로부터의 냉동건조된 펠릿의 단백질수득률은 50 중량%로 표현된다(총 27mL의 농축액이 회석되는 경우, 최종수득률은 약 60 중량%로 추정된다). 상기 공정에서 얻어진 냉동건조된 PMM은 103 중량%(Nx 6.25)의 단백질 함량을 가졌다.

<170> 실시예 15

<171> 본 실시예는 비(non)-GMO캐놀라에 대한 본 발명의 응용을 설명한다.

<172> 20℃에서, 0.15M NaCl용액 3L에 비(non)-GMO캐놀라 밀 450g을 첨가한 후 30분동안 교반하여, 8.08g/L의 단백질 함량을 가진 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 혼합물을 30분동안 방치하여, 잔여의 밀과 단백질 용액을 분리시켰다. 단백질 용액은 따라버리고 10,000xg에서 10분간 원심분리한 후, 용액의 추가적인 정화를 위하여 와트만 여과지 #4(Whatman filters #4)를 통과하여 여과시켰다.

<173> 그 다음, 여과액을, 10,000돌턴의 분자량컷오프의 막들을 이용한 공동섬유소한외여과계(hollow fibre ultrafiltration system)를 사용하여 17mL로 농축시켰다. 농축된 단백질 용액은 205g/L의 단백질 농도를 가졌다.

<174> 30℃에서, 농축물샘플 14mL를 4℃의 수돗물에서 1:9의 비율로 희석시켰다. 백색뿌옇이 즉시 형성되고, 침전을 위해 방치하였다. 상층액은 따라버리고, 침전된 점성의 끈끈한 덩어리(PMM)를 모아 냉동건조시켰다. 103 중량%(Nx6.25)의 단백질 함량을 가진 단백질로부터 2.3g의 냉동건조된 PMM이 얻어졌다.

<175> 오일 시드 밀로부터 추출한 단백질에 대하여 단백질의 총수득율은 41 중량%였다. 총 17mL의 농축액이 여과되는 경우, 약 2.66g의 건단백질이 회수되어 46 중량%의 수득율을 나타내었다.

<176> 실시예 16

<177> 본 실시예는 투석방법에 의한 캐놀라 단백질 분리체의 회수를 설명한다.

<178> 대기온도에서 'b' L의 0.15M NaCl용액에 시판용 캐놀라 밀 'a' kg를 첨가한 후 30분간 교반하여, 'c' g/L의 단백질 함량을 가지는 수용성 단백질 용액이 제공되었다. 잔여의 캐놀라 밀을 제거하고 진공여과벨트에서 세척하였다. 단백질 용액을 원심분리에 의해 정화하여 'e' g/L의 단백질 함량을 가지는 정화된 단백질 용액 'd' L가 생성되었다.

<179> 단백질추출용액의 'f' 분취량(aliquot)을, 'h' 돌턴의 분자량컷오프를 가진 막들을 이용한 한외여과계에서의 농축에 의해, 'g' L로 부피감소시켰다. 상기 농축용액은 'i' g/L의 단백질 함량을 가졌다. 농축액은 'j' 로 표시되었다. 변수들 'a' 내지 'j'는 다음의 표 11에 열거되었다.

표 11

j	BW-AL017-D17-02A	BW-AL017-D22-02A
a	150	150
b	1004	1003
c	25.1	27.1
d	1080	1132
e	18.0	16.5
f	710	1092
g	22.5	31.5
h	5000	5000
i	291.6	362.5

<181> BW-AL017-D17-02A 농축물 3.5L를 4℃의 수돗물 120L에서 투석시킨다. 수일동안 매일 물을 교환하고, 마지막 이틀동안은 흐르는 물을 사용한다. 농축액의 전도성은 6.89밀리지멘스(millisiemens, ms)에서 0.32ms로 감소한다. 전도성이 감소함에 따라, 미셀들은 농축물(retentate)을 형성하기 시작하였다. 투석 완료시, 각각의 투석튜브의 바닥에 다량의 PMM이 존재하였다. PMM은 회수되어 건조되었다. 캐놀라 단백질 분리체는 103.0 중량% d.b의 단백질 함량을 가졌다.

<182> 투석이 60℃의 물에서 수행되는 것을 제외하고는, BW-AL017-D22-02A 농축물에 대하여 상기 과정을 반복하였다. 전도성이 감소함에 따라, 용액은 뿌옇게 되고 매우 작은 미셀 형성이 일어났다. 건조된 PMM은 106 중량%의 단백질

질 함량을 가졌다.

<183>

본 발명은, 종래 달성되었던 것보다 개선된 수득율 및 단백질 함량을 보여주는 오일 시드들로부터 단백질을 분리하는 신규한 방법을 제공한다. 이 발명의 범위내에서 변형들도 가능하다.

도면의 간단한 설명

<54>

도 1은 본 발명의 하나의 실시예에 따른 오일 시드 단백질 분리체 및 다른 생성물들의 제조방법의 개략적인 흐름도이다.

도면

도면1

