



F1000096266B



(B) (11) KUULUTUSJULKAISU  
UTLAGGNINGSSKRIFT  
C (45) Patentti myönnetty  
Patent meddelat 10 06 1996

96266

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

A 23J 1/20, 3/08, A 23C 21/00

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus  
Patent- och registerstyrelsen

|                                                                                             |          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| (21) Patenttihakemus - Patentansökning                                                      | 940846   |
| (22) Hakemispäivä - Ansökningsdag                                                           | 23.02.94 |
| (24) Alkupäivä - Löpdag                                                                     | 23.02.94 |
| (41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig                                                   | 24.08.95 |
| (44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -<br>Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad | 29.02.96 |

(71) Hakija - Sökande

1. Savolainen, Jouko, Kuurinniityntie 26, 02700 Kauniainen, (FI)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Savolainen, Jouko, Kuurinniityntie 26, 02700 Kauniainen, (FI)

(74) Asiamies - Ombud: Berggren Oy Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi  
Förfarande för isolering av vassleproteiner

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

Journal of Food Science, vol. 55, nro 6, 1990, J.M. Gonzalez et al.,  
"Recovery of Proteins from sweet whey Using a Solid State Sulfitolysis", p. 1559-1563

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö kohdistuu menetelmään proteiinien eristämiseksi herasta, jossa saatetaan hera tai sen konsentraatti, sulfiitti-ionejä muodostava reagenssi ja hapettava yhdiste kosketukseen heraproteiinin sulfitolysoimiseksi ja hapettamiseksi, saostetaan sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini herasta tai sen konsentraatista happamassa pH:ssa ja otetaan saostunut sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini talteen tuoteseoksesta ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely. Käyttämällä hapettimena elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä ja lämpötilaa välillä 25-55°C, hapettava yhdiste saadaan reagoimaan suoraan sulfitolysoidun heraproteiinin kanssa, jolloin katalyytin käyttöön liittyvistä haitoista päästään.

Uppfinningen berör ett förfarande för isolering av proteiner ur vassla, där vassla eller ett koncentrat därav, ett sulfitjonbildande reagens och en oxiderande förening bringas i kontakt för sulfitolys och oxidation av vassleproteiner, det sulfitolyserade och oxiderade vassleproteinet utfälles ur vasslan eller ett koncentrat därav vid sur pH och det utfällda sulfitolyserade och oxiderade vassleproteinet tillvaratages ur produktblandningen och utsättes eventuellt för efterbehandling. Genom att som oxidationsmedel använda en oxiderande förening av livsmedelskvalitet och en temperatur mellan 25-55°C uppnås den fördelen, att den oxiderande föreningen omsättes direkt med det sulfitolyserade vassleproteinet, varvid nackdelarna med användning av oxidationskatalysatorer kan undvikas.

## Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi

Keksintö koskee menetelmää proteiinin eristämiseksi herasta, jossa

- 5 a) saatetaan hera tai sen konsentraatti, sulfiitti-ioneja muodostava reagenssi ja hapetin kosketukseen heraproteiinin sulfonoimiseksi eli sulfitolysoimiseksi ja hapettamiseksi,
- b) saostetaan sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini herasta tai sen konsentraatista happamassa pH:ssa ja
- 10 c) otetaan saostunut sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini talteen tuoteseoksesta ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely.

Heraproteiinit ovat muihin ravintoproteiineihin nähden täysin ylivoimaisia, mitä tulee niiden ravintoarvoon ja erityisesti lyysiini- ja metioniinipitoisuuteen. Heraproteiinien talteenotto ja käyttö ihmisravinnossa vähentäisi myös juustotuotannon kustannuksia. Vaikka heraproteiinin käytöllä on potentiaalia ihmisravintona, pää-  
15 esteet näyttävät tällä hetkellä olevan (1) sen talteenottoprosessin kalleus ja (2) konsentraatin tai isolaatin huonot funktionaaliset ominaisuudet, kuten liukoisuus, emulgointikyky, geelinmuodostuskyky ja vaahdonmuodostuskyky.

20

Heran proteiinien eristystä vaikeuttaa niiden hyvä liukoisuus eikä siihen voida vaikuttaa pH:n muutoksella välillä pH 2-9 proteiinien ollessa natiivissa muodossa. Proteiinien eristys tapahtuu neljän päämenetelmän mukaisesti; 1. denaturointi ja saostus, 2. ultrasuodatus, 3. ioninvaihto ja 4. kemiallinen muuntelu ja saostus.

25

Yleisimmin tunnettu menetelmä heraproteiinien eristämiseksi on denaturointi eli kuumennus ja pH:n laskeminen happamalle puolelle. Eristys on suoritettavissa taloudellisesti esimerkiksi seuraavasti: hera konsentroidaan noin 20 %:n kuiva-ainepitoisuuteen, pH säädetään välille 6,0 - 7,0, proteiinit denaturoidaan pitämällä lämpö-  
30 tila 90°C:n yläpuolella 10-30 min, minkä jälkeen proteiinit saostetaan laskemalla pH 4,4 - 5,0:aan. Tuloksena saatu proteiini on menettänyt lähes kaikki tärkeimmistä em. funktionaalisista ominaisuuksistaan. Sitä käytetään pääasiassa erilaisissa levitteissä esimerkiksi sulatejuustoissa, osittain tai kokonaan korvaamaan juusto. Hill, *et al.*, Can. Int. Food Sci. Technol. J. 15, (1982) 155-160.

35

Nykyään heran proteiinit eristetään pääasiassa proteiinikonsentraattina ultrasuodatamalla ja kuivaamalla tai proteiini-isolaattina käyttämällä ioninvaihtoadsorptiotekniikkaa ja kuivaamalla. Molemmilla menetelmillä on mahdollista saada eristetyt

proteiinit funktionaalisina. Määräävänä tekijänä näidenkin tuotantomenetelmien valinnassa on tuotteen funktionaalisuus ja sen tuotantokustannukset.

5 Proteiinikonsentraattien koostumuksessa, funktionaalisuudessa sekä aistittavissa ominaisuuksissa esiintyy suurta vaihtelua ja sen vuoksi teollisuus vieroksuu niiden käyttöä. Vaihtelu johtuu herän erilaisesta koostumuksesta, esikäsittelyn sekä valmistus- ja käsittelyolosuhteiden erilaisuudesta.

10 Proteiini-isolaateissakin esiintyy edellä mainituista syistä eri ominaisuuksien vaihtelua. Ioninvaihtoadsorptiomenetelmä niiden valmistamiseksi tasaa vaihtelua jonkin verran ja antaa koostumukseltaan erilaisen lopputuotteen kuin proteiinikonsentraatti on.

15 Julkaisun Morr ja Foegeding, Food Technol. 44 (1990) 100-112, mukaisen aineiston, jossa oli kolme heraproteiini-isolaattia ja kahdeksan konsentraattia, analyysi osoitti näiden eroavan selvästi koostumukseltaan. Konsentraattien ja isolaattien koostumuksen keskimääräiset arvot olivat vastaavasti seuraavat: proteiinipitoisuus 73,8 ja 91,0 %, ei-proteiinityppi 3,10 ja 0,32 %, vesi 5,13 ja 3,75 %, tuhka 4,27 ja 1,82 %, laktoosi 3,92 ja 0,57 % sekä rasva 5,00 ja 0,57 %.

20 Saman julkaisun mukaan isolaatit olivat selvästi funktionaalisempia ja laadukkaampia kuin konsentraatit rasvan ja proteiinin määrään nähden sekä proteiinin liukoisuuden, vaahtoavuuden ja vaahdon pysyvyyden, proteiinin denaturoimattomuuden ja kokkareisuuden sekä maun ja hajun suhteen. Konsentraattien suhteellisen korkea  
25 laktoosi- ja mineraalipitoisuus sekä heikko maku ja haju olivat tekijöitä, jotka rajoittivat konsentraattien käyttöä elintarviketeollisuudessa.

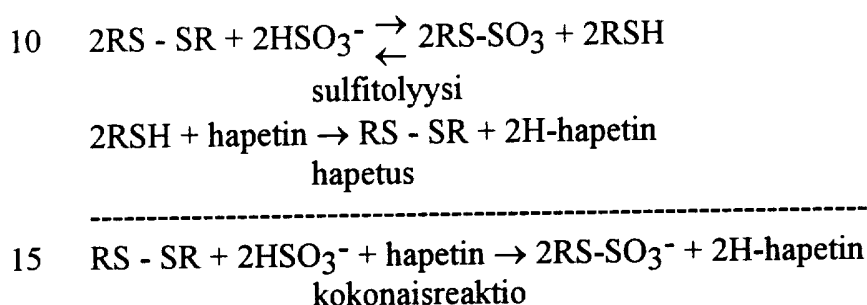
Heraproteiini-isolaattien hyviä ominaisuuksia ja käyttökelpoisuutta rajoittaa valmistusmenetelmästä johtuva tuotteen korkeahko hinta.

30 Muuttamalla proteiinien rakennetta kemiallisella reaktiolla voidaan vaikuttaa molekyylin varaukseen, avaruusrakenteeseen ja siten eräisiin muihinkin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja osittain emulgointiominaisuuksiinkin.

35 Käytännöllisin ja yksinkertaisin kemiallinen menetelmä proteiinin molekyylin rakenteen muuntelussa on oksidatiivinen sulfitolyysi eli sulfitolyysi ja hapetus. Siinä proteiinien aminohappoketjujen väliset rikkisillat eli disulfidisidokset aukaistaan,

kun lisäämällä sulfiitti-ioneja käynnistetään hapetuspelkistysreaktio, jossa toinen rikki hapettuu sulfonaatiksi ja toinen pelkistyy sulfhydryyliryhmäksi.

Lisäämällä mukaan vielä hapettava tekijä hapettuvat vapaat sulfhydryyliryhmät jälle  
 5 leen disulfididisidoksiksi, jotka puolestaan jatkavat reaktiossa niin kauan, kunnes kaikki sulfhydryyliryhmät ovat sulfonoituneet tai reaktion jokin muu tekijä on muodostunut rajoittavaksi. Oksidatiivisen sulfitolyysin periaate on kuvattu seuraavassa kaaviossa:



Siinä RS-SR kuvaa proteiinimolekyyliä, joka koostuu kahdesta aminohappoketjusta R, jolloin S-S on kahden aminohappoketjun välissä oleva disulfididisidos, joka  
 20 yhdistää aminohappoketjut ja pitää niitä osaltaan lukittuna tiettyyn asentoon. Muunnetut proteiinimolekyylit ovat saostettavissa liuoksesta laskemalla pH:ta sulfitolyysireaktion pH:sta pH 3-5:een.

Oksidatiivista sulfitolyysiä on julkaisussa Kella, N.K.D., *et al.*, J. Agr. Food Chem.,  
 25 37 (1989), 1203-1210, käytetty heran proteiini-isolaattien molekyyliden muunteluun tarkoituksena vaikuttaa proteiinien funktionaalsiin ominaisuuksiin kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja vaahdon pysyvyyteen. Ominaisuuksiin vaikuttavana tekijänä oli disulfididisidosten vähentäminen suhteessa alkuperäisten disulfididisidosten kokonaismäärään. Tiedetyt ominaisuudet paranivat tai huononivat disulfididisidosten vähetessä. Mm. liukoisuus huononi alle 5 %:n jo 25 %:n disulfididisidok-  
 30 sista kadottua ja samalla liukoisuus-pH-käyrän liukoisuusminimi muuttui seuraavasti; disulfididisidosten poistuma %:eina sekä vastaava liukoisuusminimi pH-asteikolla: 25 % - pH 4,75; 50 % - pH 4,38; 75 % - pH 4,2; ja 100 % - pH 4,0.

35 Muuntelureaktiossa proteiini-isolaattien konsentraatio oli 1,0 % ja sulfiitin 0,1 M, urean 4 M sekä pH 7,0 ja lämpötila 25°C. Hapettavana tekijänä käytettiin liuoksen läpi puhallettua happea ja katalysaattorina CuSO<sub>4</sub>:a liuotettuna 800 mM konsentraatioon. Eriasteisesti muunnellut proteiini-isolaatit eristettiin saostamalla ammo-

niumsulfaatilla, jota lisättiin liuokseen niin paljon, että siitä muodostui 50 %:isesti kyllästetty. Muuttuneita liukoisuusominaisuuksia ei käytetty hyväksi proteiinien eristämisessä.

- 5 Julkaisussa Gonzalez, J.M., Damodaran, S., J. Food Sci., 55 (1990) no 6, 1559-1563, käytettiin oksidatiivista sulfitolyysia tarkoituksena eristää sellaisen makean raaka-heran proteiineja, jonka proteiinipitoisuus on noin 0,6 %, lähes samoissa koeolosuhteissa kuin edellä; pH 7,0, sulfiittikonsentraatio 0,1 M, lämpötila 25°C sekä hapettimena happi ja katalysaattorina  $\text{Cu}^{++}$ -ioni  $\text{CuCO}_3$ :na, mutta tässä tapauksessa
- 10 kiinteinä helminä ja pakattuna lasikolonniiin. Sulfitolyysin tuote hapetettiin sulfo-naattijohdannaiseksi kierrättämällä sitä mainituilla helmillä täytetyssä kolonnissa. Sen jälkeen helmijäännökset poistettiin nestemäisestä reaktioseoksesta sentrifugoi-malla. Sulfonoidut ja kuparin kanssa kelatoituneet proteiinit eristettiin funktionaali-sina saostamalla pH:ssa 4,5. Ennen saostamista liuoksesta jouduttiin kuitenkin
- 15 poistamaan sulfonoituun heran proteiiniin kelatoitunut kupari EDTA-käsittelyllä. Tässäkin oli kysymyksessä työläs ja monimutkainen laboratoriomittakaavan toteutus kalliilla laitteistolla ja kemikaaleilla, kuten edellisessä artikkelissa. Korotetun läm-pötilan reaktiota nopeuttavaa vaikutusta ei voida hyödyntää, sillä hapen liukoisuus ja siten sen pitoisuus alenee. Suolatkin alentavat liuoksen happipitoisuutta.
- 20 Heran proteiinien eristämistä toimivina tuotteina taloudellisesti on pyritty toteutta-maan jo kauan käyttämällä hyväksi monenlaisia menetelmiä, mutta esitetyt ratkaisut ovat olleet puutteellisia useastakin syystä.
- 25 Edellä esitetyt sovellutukset, jotka perustuivat oksidatiiviselle sulfitolyysille, eivät joko pyrkineet tarjoamaan ratkaisua eristämiseksi, vaan ainoastaan tiettyjen ominai-suuksien muunteluun, tai esitetty ratkaisu on niin vaikeasti hyödynnettävissä tuotan-tomitassa, ettei se ole ollut toteuttamiskelpoinen.
- 30 Keksinnön tarkoituksena on aikaansaada menetelmä heran proteiinien eristämiseksi, joka on mahdollisimman taloudellinen ja yksinkertainen. Keksinnössä pyritään myös sellaiseen heran proteiinien eristämismenetelmään, joka tuottaa mahdollisim-man funktionaalista eli emulgointikykyistä, geelinmuodostuskykyistä ja vaahdon-muodostuskykyistä proteiinia. Tavoitteena on myös mahdollisimman terveellisen ja
- 35 miellyttävän sekä ihmisravinnoksi kelpaavan heran proteiinien valmistusmenetelmä.

Keksinnössä pyritään myös menetelmään, jolla proteiinin koostumus saadaan halu-tuksi.

Nämä tavoitteet on nyt saavutettu uudella menetelmällä heran proteiinien eristämiseksi, jolle pääasiassa on tunnusomaista se, mitä sanotaan patenttivaatimuksen 1 tunnusmerkkiosassa.

- 5    Keksinnössä on siis oivallettu, että sellaisessa menetelmässä, jossa heraproteiini sulfitolysoidaan, hapetetaan ja saostetaan, hapettimena kannattaa käyttää elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä oleellisesti ilman katalysaattoria ja sellaista välillä 25-55°C olevaa lämpötilaa, jossa hapettava yhdiste reagoi suoraan sulfitolysoidun heraproteiinin kanssa. Kannattaa siis käyttää korkeampia lämpötiloja kuin aiemmin
- 10   reaktioiden nopeuttamiseksi ja reaktiotasapainojen siirtämiseksi tuotteiden puolelle sekä uusien, elintarvikelaatuisten hapetinten käytön mahdollistamiseksi. Hapettavana tekijänä kannattaa käyttää elintarvikelaatuista kemikaalia, joka toimii optimaalisesti käytetyissä olosuhteissa aiheuttamatta vahingollisia sivureaktioita. Tässä suhteessa eo. keksintö poikkeaa edukseen em. julkaisun Gonzalez et al. menetelmästä,
- 15   jossa ei käytetä korotettua lämpötilaa ja joudutaan käyttämään hapettimen lisäksi katalysaattoria, joka on poistettava sekä reaktioseoksesta että valmiista lopputuotteesta.

- Keksinnön mukaisen menetelmän lähtöaineena käytetään joko juustontuotannosta
- 20   saatavaa heraa sellaisenaan tai sitten sen konsentraattia. On edullista, mikäli vaiheen a) sulfitolyyssissä ja hapetuksessa käytetään raaka-aineena herakonsentraattia, jonka väkevyys on 4-16-kertainen verrattuna heraan, jolloin sen heraproteiinipitoisuus on edullisesti noin 2-7 paino/tilavuus-%. Eristettävien proteiinien saannon parantamiseksi ja prosessissa tarvittavien kemikaalien määrän vähentämiseksi hera konsentroidaan siis edullisesti siten, että poistettu vesimäärä on vähintään noin 75 paino-%.
- 25   :

- Keksinnössä heran tai sen konsentraatin proteiinit saatetaan reagoimaan sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa. Sulfiittia muodostavana reagenssina voidaan käyttää mitä tahansa kemian alalla tunnettua sulfiitti-iona muodostavaa reagenssia.
- 30   Erään suoritusmuodon mukaan sulfiitti-iona muodostavana reagenssina käytetään sulfiittia, vetysulfiittia ja/tai metabisulfiittia. Tällöin ko. suolojen kationisena komponenttina voidaan käyttää mitä tahansa suolan kationia, kuten ammoniumia, tai jaksollisen järjestelmän jonkin ryhmistä 1-4 metallia, kuten alkalimetallia tai maa-alkalimetallia. On edullista käyttää sulfiittia muodostavana reagenssina alkalimetallin tai maa-alkalimetallin sulfiittia, vetysulfiittia ja/tai metabisulfiittia, edullisimmin
- 35   natriumsulfiittia, natriumvetysulfiittia ja/tai natriummetabisulfiittia. Olemme havainneet, että kaikkein parhaimmat tulokset saadaan, mikäli eo. keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään natriumvetysulfiittia.

- Lopputuotteiden toiminnallisiin ja muihin ominaisuuksiin pystytään vaikuttamaan valmistusprosessin sulfitolyysissä määrittelemällä sulfiitin määrän suhde heraproteiinissa olevien disulfidisidosten määrään. Tyypillinen tapa laskea heraproteiinin sulfitolyysiin tarvittava sulfiittimäärä löytyy em. julkaisusta Gonzalez, J.M. ja Damodaran, S., J. Food Sci. 55 (1990), 1559-1563, jonka esitys liitetään tähän viitteeksi. Erään suoritusmuodon mukaan vaiheen a) sulfitolyysissä sulfiittia muodostavan reagenssin pitoisuus on sellainen, että sulfiitin konsentraatio sulfitolyysiseoksessa on välillä noin 0,02 - 0,20 M, edullisesti 0,05-0,10 M.
- 10 Menetelmän vaiheessa a) suoritetaan siis heran tai sen konsentraatin proteiinien sulfonointi eli sulfitolyysi ja hapetus. Hapettimena käytetään keksinnön mukaisesti elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä ja sellaista lämpötilaa, jossa tämä hapettava yhdiste reagoi spontaanisti ja suoraan sulfitolysoidun heraproteiinin kanssa. Elintarvikekelpoisia hapettimia tunnetaan alalla paljonkin, mm. elintarvikkeiden ja
- 15 niiden puolivalmisteiden valkaisusta, kypsentämisestä ja vettämisestä. Kirjallisuus mainitsee mm. erilaiset entsyymit, kuten aspergillus-flavus-oryzae-entsyymi, orgaaniset peroksidit, kuten asetoniperoksidi ja bentsoyyliperoksidi, epäorgaaniset peroksidit ja peroksisuolat, kuten ammoniumperoksisulfaatti, kaliumperoksisulfaatti ja kalsiumperoksidi, myrkyttömät atsoyhdisteet, kuten atsodikarbonamidi (ADA), nitrosyylikloridi, L-kysteiini, halogenaatit kuten kaliumbromaatti, bromaatien ja jodaattien seokset, sekä kalsium- tai kaliumjodaatti. Myös yhdisteitä, kuten kalsiumstearoyyli-2-laktylaattia, klooria, puhdasta happea ja askorbiinihappoa on käytetty elintarvikekelpoisina hapettimina. On edullista, mikäli eo. keksinnön vaiheessa a) käytetään elintarvikelaatuisena ja hapettavana yhdisteenä elintarvikelaatuista peroksidiyhdistettä ja/tai halogenaattia, edullisesti vastaavasti kalsiumperoksidia  $\text{CaO}_2$  ja/tai kaliumbromaattia  $\text{KBrO}_3$ . Edullinen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen pitoisuus on välillä noin  $0,01 \cdot O_{\text{act}} - 0,15 \cdot O_{\text{act}}$  paino/tilavuus -%, jossa  $O_{\text{act}}$  tarkoittaa yhdisteen aktiivisen hapen pitoisuutta.
- 20
- 25
- 30 Keksinnön mukaisen menetelmän optimoimiseksi on määriteltävä myös sopiva reaktiolämpötila, saostuksessa käytetty pH sekä pH:n muutoksissa käytetyt hapot ja emäkset sekä sopivat toimenpiteet ja menetelmät haluttujen ominaisuuksien saamiseksi tuotteelle, joka voi olla proteiinitahnaa tai suihkekuivattua jauhetta.
- 35 Erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaiheen a) sulfitolyysi- ja hapetuslämpötila on noin 30-50°C. Edullinen pH, jossa sulfitolyysi ja hapetus tapahtuu on välillä noin 5,0 - 8,5.

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan vaiheen a) sulfitolyysi ja hapetus suoritetaan kahdessa alivaiheessa siten, että a<sub>1</sub>) saatetaan hera tai sen konsentraatti kosketukseen sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa heraproteiinin sulfitolysoimiseksi ja a<sub>2</sub>) saatetaan vaiheen a<sub>1</sub>) sulfitolysoitu heraproteiini kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa sulfitolysoidun heraproteiinin hapettamiseksi. Tällöin alivaihe a<sub>1</sub>) suoritetaan edullisesti pH:ssa noin 6,0 - 7,5 ja edullisimmin pH:ssa 6,5 - 7,0, jolloin reaktioaika on edullisesti noin 10-50 minuuttia. Alivaihe a<sub>2</sub>) suoritetaan edullisesti pH:ssa noin 5,0 - 7,0 ja edullisimmin pH:ssa noin 5,5 - 6,5, jolloin reaktioaika on edullisesti noin 15-60 minuuttia. Vaiheissa a<sub>1</sub>) ja a<sub>2</sub>) käytetään edullisesti samaa eli edellä mainittua vaiheen a) lämpötilaa.

Edellä mainituilla tekijöillä pystytään vaikuttamaan myös lopputuotteen toiminnallisten ja muiden ominaisuuksien lisäksi saostettujen proteiinien saantoon sekä heran sisältämien eri proteiinien,  $\beta$ -laktoglobuliini,  $\alpha$ -laktalbumiini ja naudanseerumialbumiini (BSA), määräsuhteisiin saosteessa ja suodoksessa.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä suoritetaan ensin heran tai sen konsentraatin sulfitolyysi ja hapetus ja sen jälkeen sulfolysoidun ja hapetetun heraproteiinin saostus heran tai sen konsentraatin reaktioseoksesta happamassa pH:ssa. Saostusvaihe b) suoritetaan edullisesti käyttämällä pH-arvoa noin 2,5 - 6,5 ja kaikkein edullisimmin pH-arvoa 3,0 - 5,0. Tällöin sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini saostuu ja pH:n ollessa selvästi happaman puolella ja lämpötilan ollessa tarpeeksi korkea, edullisesti välillä 25-55°C, edullisimmin välillä 30-50°C, tapahtuu lisäksi sulfitolyysissä ja hapetuksessa syntyneiden sulfoniryhmien poistuminen rikkidioksidina, joka johdetaan vastaanottosäiliöön käytettäväksi uudelleen sulfitolyysissä. Siten sulfitolyysin rikkidioksidi saadaan talteen eikä prosessi rasita ympäristöä.

On edullista, mikäli keksinnön mukaisen menetelmän saostusvaiheessa b) käytetään hidasta pH-arvon säätämistä mainittuun saostus-pH-arvoon. Erityisen edullista on, mikäli pH-arvon säätö siirryttäessä vaiheen a) sulfitolyysistä ja hapetuksesta vaiheen b) saostukseen tapahtuu 10-40 minuutin aikana. Yleensä vaiheen b) pH:n säädön jälkeen suoritetaan seoksen sekoitus, joka edullisesti kestää noin 10 - 60 minuuttia.

35

Eristämisprosessissa syntyy helposti viivytyksiä, jos sulfonointi- ja saostamisvaiheessa b) käytetään peräkkäistä käsittelyä. Nopeutumista voidaan helposti aikaansaadaksi käyttämällä ns. vuorokäsittelyä, jolloin toista reaktoria voidaan samaan aikaan

tyhjentää ja täyttää uudelleen, kun toisessa reaktorissa tapahtuu sulfonointi ja saostaminen.

- Keksinnön mukaisessa menetelmässä oksidatiivinen sulfitolyysi saadaan siis aikaan elintarvikelaatuisella, hapettavalla kemikaalilla, jonka aiheuttama reaktio on säädettävissä kemikaalin määrällä ja ulkoisilla olosuhteilla, kuten pH:lla, lämpötilalla ja vaikutusajalla niin, että lopputulos on halutun laatuinen maun, ravitsevuuden, toimivuuden ja proteiinikoostumuksen suhteen.
- 5
- 10 Saostusvaiheen b) jälkeen seuraa loppuvaihe c), jossa saostunut sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini otetaan talteen tuoteseoksesta ja mahdollisesti jälkikäsitellään. Erään suoritusmuodon mukaan vaiheessa b) saostettu sulfolyysoitu ja hapetettu heraproteiini konsentroidaan ja pestään vaiheessa c), edullisesti mikrosuodatuksen avulla. Eristystä voidaan jatkaa siten, että vaiheen c) saostekonsentraatista poistetaan
- 15 vesi sentrifugoimalla tai suodattamalla esim. nauha- tai rumpusuodattimella, jolloin tuloksena syntyy käyttökelpoista proteiinitahnaa. Proteiinitahna voidaan tehdä tuotteena käyttökelpoisemmaksi nostamalla sen pH arvoon 6-8 emäksellä tai emäseoksella, joka edullisesti on NaOH tai NaOH:n,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :n ja KOH:n seos, jolloin  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :n määrä edullisesti on sellainen, että se korvaa vähintään alkuperäisen
- 20 Ca:n määrän.

- Vaiheen c) saostekonsentraatin jatkojalostus voidaan myös suorittaa siten, että se suihkukuivataan jauhetuotteeksi, jolloin saostekonsentraatin pH on edullisesti säädetty sitä ennen arvoon 6-8 emäksellä tai emäseoksella, joka edullisesti on sama
- 25 kuin em. tahnan pH:n säädössä.

- Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan heran proteiinien eristäminen tapahtuu seuraavina jaksoina: heran konsentroidi ultrasuodattamalla, konsentraatin proteiinien rakenteen muuttaminen sulfitolyysin ja hapetuksen avulla, saostaminen laske-
- 30 malla pH:ta, saostuneiden proteiinien konsentroidi ja pesu mikrosuodattamalla, erottaminen sentrifugoimalla tai suodattamalla tai suihkukuivauksella ja saostumattomien proteiinien konsentroidi ja pesu ultrasuodattamalla sekä erottaminen suihkekuivauksella.
- 35 Heran konsentroidi aloitetaan mikrosuodatuksella, jolloin herasta poistetaan mahdolliset kaseiinihiukkaset, vähennetään bakteerien määrää sekä fosfolipoproteiinien määrää. Mikrosuodatuksen tuloksena ultrasuodatus helpottuu.

Saatua mikrosuodatuksen suodosta ultrasuodatetaan 9000-40000 D:n kalvoilla proteiinipitoisuuden väkevöimiseksi alkuperäisestä noin 0,6 %:sta 4-16-kertaiseksi, mikä vastaa 2-7 %:n proteiinimäärää. Edullinen konsentraatin proteiiniväkevyys on alkuperäisestä 8-kertainen eli noin 4 %. Silloin konsentraatin kuivapaino on 11-12 %, mikä johtuu pääasiassa laktoosista proteiinin lisäksi.

Herakonsentraatin proteiinien rakenteen muuttaminen tapahtuu sulfitolyysin ja hapetuksen avulla, jolloin disulfididisosten sulfhydryyliryhmät sekä vapaat sulfhydryyliryhmät sulfonoidaan määrällisesti halutulle tasolle. Heraproteiinien sulfitolyysi ja hapetus toteutetaan tässä suoritustavassa seuraavalla tavalla:

Herakonsentraattia, proteiinipitoisuus esimerkiksi 4 %, otetaan tarvittava määrä reaktoriin, jossa on tehokas sekoitus sekä lämpötilan ja pH:n mittausta ja säätö.

Konsentraatin lämpötilaksi säädetään 30°-50°C, esim. 35°-45°C. Lämpötilan valinta johtuu mm. halutusta reaktionopeudesta, käytetyistä kemikaaleista sekä eristettävälle proteiineille halutuista funktionaalisista ja muista ominaisuuksista. Vakiolämpöiseen herakonsentraattiin lisätään sulfiittia joko NaHSO<sub>3</sub>:na, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:nä tai Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>:na 0,02-0,2 M, esim. 0,05-0,1 M, ja sekoitetaan tehokkaasti. Lisättävän sulfiitin määrä riippuu mm. proteiinikonsentraatiosta ja halutusta sulfitolyysiasteesta.

pH säädetään välille 6,0-7,0, esim. 6,5. pH:n säädössä käytetään elintarvikelaatuisia happoja ja emäksiä, kuten HCl:a ja NaOH:ta. Reaktioaika, jona sulfiitti vaikuttaa proteiineihin, on 10-50 minuuttia, edullisesti 20-40 minuuttia. Aika määräytyy edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutuksesta halutun reaktiotasapainon saavuttamiseksi.

Tämän jälkeen lisätään reaktoriin hapetin. Hapettimena tulevat kyseeseen ne elintarvikelaatuiset hapettavat kemikaalit, joiden aktiivisuus on hallittavissa kyseisissä olosuhteissa niin, että proteiinit saadaan tehokkaasti eristetyksi ja niille halutut ominaisuudet sekä koostumus. Käyttökelpoisia kemikaaleja ovat mm. bromaatit, esim. KBrO<sub>3</sub> (aktiivisen hapen määrä 28,6 %), ja peroksidit, esim. CaO<sub>2</sub> (aktiivisen hapen määrä 22,2 %). Hapettimen määrä määräytyy hapetettavien sulfhydryyliryhmien sekä hapettimen aktiivisen hapen määrän mukaan, esim. CaO<sub>2</sub>:n määrä on 0,1-1,0 %, edullisesti 0,2-0,6 %, seoksen tilavuudesta (paino/tilavuus-%) herakonsentraatissa, jossa proteiinipitoisuus on 2-7 %.

Herakonsentraatin pH:ksi säädetään 5,0-7,0, esim. 5,5-6,5. pH:n valinta riippuu siitä, kuinka nopeaksi hapetusreaktio halutaan ja miten sen halutaan vaikuttavan lopputuotteen ominaisuuksiin. Reaktiolämpötila voidaan pitää samana kuin sulfitylysissä tai muuttaa edellä annettujen arvojen puitteissa reaktionopeuden säätely-

5 sekksi.

Reaktioaika voi olla 15-60 minuuttia, edullisesti 30-45 minuuttia. Tänä aikana konsentraattia sekoitetaan tehokkaasti. Ajan pituudella voidaan vaikuttaa reaktion täydellisyyteen ja aktiivisuuden kanssa proteiinien saantoon, koostumukseen ja ominai-

10 suuksiin.

Oksidatiivisen sulfitylyysin kaikilla tärkeillä muuttujilla eli herakonsentraatin proteiinipitoisuudella, sulfiitin määrällä, reaktioseoksen eri vaiheissa käytetyillä pH:illa ja lämpötiloilla, hapettavan yhdisteen ominaisuuksilla ja määrällä sekä eri vaiheissa käytetyillä reaktioajoilla voidaan vaikuttaa eristysprosessin eri osareaktioiden toteutumiseen ja kokonaisuutena koko prosessin lopputulokseen eli eristettävien proteiinien määrään, koostumukseen ja haluttuihin ominaisuuksiin.

15

Proteiinit, halutun muuntelun jälkeen, saostetaan laskemalla pH hitaasti 3,5-5,0:aan edullisesti 4,0-4,5:een. Saostuksessa käytettävä pH riippuu mm. oksidatiivisen sulfitylyysin asteesta eli mikä osa olemassa olevista disulfidisidoksista ja vapaista sulfhydryyliryhmistä on sulfonoitu. Saostamiseen käytetty aika on 10-60 minuuttia, esim. 20-40 minuuttia. Saostettujen proteiinien konsentroidi ja pesu tapahtuu mikro-suodattamalla sekä erotus suodattamalla nauha- tai rumpusuodattimella tai sentrifugoimalla, jolloin tuotteena saadaan proteiinitahnaa.

20

25

Pesu on konsentroinnin yhteydessä tärkeää, koska siinä voidaan poistaa konsentraatissa oleva laktoosi ja samalla muuntelussa saostuksessa lisätyt ylimääräiset kemikaalit ja syntyneet suolat, jotka muutoin jäisivät proteiinivalmisteeseen.

30

Lopullinen tuote valmistetaan tahnasta nostamalla sen pH 6-8:aan lisäämällä NaOH:ta ja  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :ta tai NaOH:ta, KOH:ta ja  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :ta sopivassa suhteessa. Kalsiumin lisääminen eristettyihin heraproteiineihin palauttaa niiden alkuperäisen kalsiumtasapainon sekä parantaa niiden geeliytymisominaisuuksia. Saostekonsentraatti on myös kuivattavissa suihkekuivaimella, jolloin tuote on kuiva jauhe. Pestyn saostuman pH on nostettava 6-8:aan ennen kuivaamista käyttämällä edellä mainittuja emäksiä, millä saadaan samat ominaisuudet myös kuivatulle tuotteelle.

35

Saostettuja proteiineja konsentroitaessa mikrosuodatuksella syntynyt suodos konsentroidaan ja pestään ultrasuodattamalla. Pestyn konsentraatin pH säädetään 6-8:aan käyttämällä edellä mainittuja emäksiä ja kuivataan suihkekuivaimella jauheeksi.

5

Seuraavat esimerkit kuvaavat edellä esitettyä keksintöä.

#### Esimerkki 1

10 Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynyttä esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 0,60 % (proteiinityyppi x 6,38) ja kokonaistypen (muutkin typpiyhdisteet) mukaan laskettu proteiinipitoisuus 0,80 %, mikrosuodatettiin 0,45 µ:n suodattinkalvolla Millipore Pellicon-laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodosta konsentroidiin ultrasuodattamalla samalla laitteistolla 10000 D:n ultrasuodatuskalvojen läpi niin, että osa suodoksesta konsentroidiin 4 x:ksi ja osa 8 x:ksi eli konsentraattien lopputi-

15 lavuudet olivat vastaavista alkutilavuuksista 25 % ja 12,5 %. Vastaavat proteiinipitoisuudet olivat 2,06 paino/tilavuus-% ja 4,01 paino/tilavuus-%. Eristämistä varten otettiin 4 x:stä herakonsentraattia 1,0 l 2 l:n lasiastiaan. Sitä pidettiin lämpötilaltaan säädettävässä vesihauteessa ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla sekoittimella. Konsentraatin lämpötila säädettiin 35°C:een. Sulfitolyysin käynnistämiseksi konsentraattiin lisättiin 5,2 g NaHSO<sub>3</sub>:a ja pH säädettiin 6,5:een lisäämällä NaOH:ta.

20 Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 minuuttia. Sen jälkeen seokseen lisättiin KBrO<sub>3</sub>:a 1,0 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusreaktio kesti 15 minuuttia. Tämän jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,40:een lisäämällä seokseen HCl. Saostumaa sekoitettiin vielä 30 minuuttia.

25

Saostuma erotettiin sentrifugoimalla Sorvall RC-5B-sentrifugissa 10000 kierr./min 30 minuuttia. Saostetut proteiinit erottuivat hyvin. Proteiinit pestiin suspendoimalla ne tislattuun veteen ja sentrifugoimalla uudelleen. Proteiinimassa oli helposti irtoavaa ja lohkesi helposti palasiksi. Se varastoitiin kannelliseen lasiastiaan ja pakastettiin.

30 Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 3,0 g/100 ml herakonsentraattia. Proteiinisaanto määritettiin sentrifugoimalla 20 ml:n saostemäärä + 10 ml tislattua vettä 50 ml:n sentrifugiputkissa 30 minuuttia 10000 kierr./min. Sentrifugoinnin jälkeen kirkaste kaadettiin pois ja putkia pidettiin ylösalaisin vettä imevällä alustalla noin 15 minuuttia irtoveden valuttamiseksi, minkä jälkeen ne punnittiin 5-10 minuutin sisällä. Rinnakkaismääritysten tulokset olivat hyvin lähellä toisiaan. Näin saadut tulokset korreloivat hyvin proteiinimääritysten kanssa, mutta olivat sitoutuneen vesimäärän verran suurempia. Määritykset olivat huomattavasti nopeampia ja helpompia tehdä ja siksi niitä käytettiin saantojen määrittämisessä.

35

### Esimerkki 2

1,0 l 8 x konsentroitua edellisessä esimerkissä mainittua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 4,01 %, lämmitettiin 45°C:iseksi ja sekoitettiin tehokkaasti. Siihen lisättiin NaHSO<sub>3</sub>:a 10,40 g. pH säädettiin 6,5:een. Sulfitolyysin reaktioaika  
5 oli 30 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin KBrO<sub>3</sub>:a 2,0 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetuksen reaktioaika oli 15 minuuttia. Hapetusajan päätyttyä proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Seosta sekoitettiin vielä 30 minuuttia saostuksen loppuunsaattamiseksi.

- 10 Proteiinit erotettiin ja pestiin sentrifugoimalla kuten esimerkissä 1. Proteiinit olivat helposti irtoavia ja lohkottavissa helposti palasiksi. Eristetty proteiinimassa pakastettiin kannellisessa lasiastiassa myöhempää käyttöä varten. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,0 g/100 ml herakonsentraattia.

### 15 Esimerkki 3

- Esimerkki 1:ssä selostetulla tavalla 4 x konsentroitua edam-juuston valmistuksessa syntynyttä ja separoitua esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 1,92 %, otettiin 1,0 l ja lämmitettiin 35°C:een sekoittaen tehokkaasti. Konsentraattiin lisättiin NaHSO<sub>3</sub>:a 5,2 g. pH säädettiin ja pidettiin 6,5:ssä. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Sulfitolyysi-  
20 reaktion jälkeen seokseen lisättiin CaO<sub>2</sub>:ta (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa; aktiivisen hapen määrä noin 13,3 %) 2,2 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusaika oli 15 minuuttia, jona aikana seosta sekoitettiin tehokkaasti. Hapetuksen jälkeen proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia. Proteiinit erotettiin ja pestiin sekä varastoitettiin kuten esimerkissä 1. Eristetty proteiinimassa oli pehmeää, haurasta eikä helposti levitettävissä.  
25 Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 1,75 g/100 ml herakonsentraattia.

### Esimerkki 4

- Esimerkki 3:ssa valmistetuista herakonsentraateista otettiin 1,0 l 8 x väkevöityä konsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli myös 4,01 %. Konsentraatti lämmitettiin  
30 45°C:een ja sekoitettiin tehokkaasti. Siihen lisättiin 10,40 g NaHSO<sub>3</sub>:a. pH säädettiin ja pidettiin 6,5:ssä. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin CaO<sub>2</sub>:ta (Ixper 60 C, Peroxid Chemie GmbH, Saksa) 4,3 g. pH pidettiin edelleen 6,5:ssä. Hapetusaika oli 15 minuuttia. Hapetuksen jälkeen proteiinit saostettiin  
35 laskemalla pH 4,45:een HCl:lla. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia. Proteiinit erotettiin ja pestiin sekä varastoitettiin kuten esimerkissä 1. Proteiinimassa oli pehmeähköä ja haurasta eikä levityskelpoista. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,85 g/100 ml herakonsentraattia. Proteiinimassasta otettiin kaksi noin 10 g:n

- näytettä, joista toisen pH nostettiin noin 6,5:een lisäämällä 1,0 N NaOH:ta 0,4 ml:a ja sekoittamalla hyvin ja toiseen lisättiin 1,0 N NaOH:ta 0,25 ml ja 0,15 ml kyllästettyä  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :ta. pH:n noston jälkeen ensimmäinen näyte oli pehmeää, levitettävää, ei kokkareista eikä tarttuvaa. Toinen näyte oli edellistä vähän jäykempi mutta
- 5 levitettävää, ei kokkareista eikä tarttuvaa.

#### Esimerkki 5

- Separoitua tuoretta edam-juuston valmistuksessa syntynyttä esiheraa, jonka proteiinipitoisuus oli 0,59 % mikro- ja ultrasuodatettiin samoilla laitteilla ja saman ohjelman mukaan kuin esimerkissä 1 8 x:ksi ja 16 x:ksi, jolloin niiden proteiinipitoisuudet olivat vastaavasti 3,92 % ja 7,00 %. 1,0 l 8 x konsentroitua herakonsentraattia proteiinipitoisuudeltaan 3,92 % lämmitettiin 45°C:iseksi ja sitä sekoitettiin jatkuvasti.
- 15 Siihen lisättiin  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ :tä 9,50 g. pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Sulfitolyysin reaktioaika oli 15 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin  $\text{CaO}_2$ :ta 4,30 g. pH säädettiin 5,5:een ja hapetuksen reaktioaika oli 30 minuuttia. Hapetuksen päätyttyä seoksen pH laskettiin 4,0:aan HCl:lla proteiinien saostamiseksi. Saostumaa sekoitettiin vielä 15 minuuttia. Saoste mikrosuodatettiin 0,45 µ:n kalvolla samalla Milliporen laboratoriolaitteella, jolla herakin käsiteltiin ja konsentroitui noin 2 x:ksi.
- 20 Suodatus sujui nopeasti ja suodos oli kirkas, mikä osoitti, ettei saostuneita proteiineja tullut suodatuskalvon läpi. Konsentraatti pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä. Konsentraatin pH nostettiin 6,5:een. Konsentraatin kuiva-ainepitoisuus ja tuhka oli noin 30 % alkuperäisestä pitoisuudesta, mikä oli tarkoituskin.
- 25 Konsentraatti kylmäkuivattiin ja säilytettiin kylmiössä myöhempää käyttöä varten. Suodoksesta tehtiin HPLC:llä määrittäminen heran proteiinien määrasuhteiden säilymisestä saostamisen ja eristämisen jälkeen. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 9,3 g/100 ml herakonsentraattia.

#### Esimerkki 6

- 1,0 l edellisessä esimerkissä mainittua 8 x konsentroitua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 3,93 %, lämmitettiin 45°C:iseksi ja sekoitettiin jatkuvasti. Siihen lisättiin  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ :tä 9,5 g ja pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Sulfitolyysi kesti 15 minuuttia. Tämän jälkeen lisättiin seokseen hapettimena  $\text{CaO}_2$ :a 2,2 g ja pH
- 35 säädettiin 5,5:een. Reaktioaika oli 30 minuuttia. Proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,0:aan HCl:lla. Seosta sekoitettiin vielä 15 minuuttia. Saoste konsentroitui mikrosuodatuksella 2 x:ksi ja pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä kuten edellisessä esimerkissä. Saostekonsentraatin pH nostettiin 6,6:een. Sen kuiva-aine-

pitoisuus aleni alkuperäisestä noin 31 %:iin. Saostekonsentraatti kylmäkuivattiin ja säilytettiin kylmiössä. Mikro-suodatuksen suodosta konsentroidiin noin 2 x ultrasuodattamalla 10000 D:n kalvolla Milliporen laboratoriolaitteella, kuten esimerkeissä käytettyjä herakonsentraatteja valmistettaessa. Suodostekonsentraatti pestiin kaksi kertaa omalla tilavuudella tislattua vettä, minkä jälkeen sen pH nostettiin 6,4:ään. Konsentraatin kuiva-ainepitoisuus pieneni alkuperäisestä noin 31 %:iin. Konsentraatti kylmäkuivattiin säilytystä varten. Saosteen mikro-suodoksesta tehtiin HPLC:llä määrittys heran proteiinien määräsuhteiden säilymisestä käsittelyn ja saostuksen jälkeen. Verrattaessa tuloksia edellisen esimerkin tuloksiin huomattiin proteiinien määräsuhteiden muuttuvan erilaisen käsittelyn tuloksena. Erilaisella käsittelyllä voidaan vaikuttaa proteiinisaantoihin ja myös vaikuttaa saosteen ja suodoksen proteiinien määräsuhteisiin. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 8,1 g/100 ml herakonsentraattia.

#### 15 Esimerkki 7

1,0 l esimerkissä 5 mainittua 16 x konsentroitua herakonsentraattia, jonka proteiinipitoisuus oli 7,0 %, lämmitettiin 45°C:een samalla sekoittaen. Siihen lisättiin  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ :a 12,6 g. pH säädettiin 6,5:een. Sulfitolyysin reaktioaika oli 15 minuuttia. Tämän jälkeen seokseen lisättiin  $\text{CaO}_2$ :ta 4,3 g. pH säädettiin 6,0:aan. Hapetus-aika oli 30 minuuttia. Proteiinit saostettiin laskemalla pH 4,0:aan. Sekoitusta jatkettiin vielä 15 minuuttia saostuksen loppuunsaattamiseksi. Proteiinit erotettiin ja pestiin sentrifugoimalla kuten esimerkissä 1. Eristetty proteiinimassa pakastettiin kannellisesä lasiastiasä myöhempää käyttöä varten. Sentrifugoimalla määritetty proteiinisaanto oli 12,0 g/100 ml herakonsentraattia.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä proteiinien eristämiseksi herasta, jossa
  - a) saatetaan hera tai sen konsentraatti, sulfiitti-ioneja muodostava reagenssi ja hapetin kosketukseen heraproteiinin sulfonoimiseksi eli sulfitolysoimiseksi ja hapettamiseksi,
  - b) saostetaan sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini herasta tai sen konsentraattia happamassa pH:ssa ja
  - c) otetaan saostunut sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini talteen tuoteseoksesta ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely,
- 10 **tunnettu** siitä, että vaiheessa a) käytetään hapettimena elintarvikelaatuista hapettavaa yhdistettä oleellisesti ilman katalysaattoria ja sellaista välillä 25-55°C olevaa lämpötilaa, jossa hapettava yhdiste reagoi suoraan sulfitolysoidun heraproteiinin kanssa.
- 15 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa a) käytetään herakonsentraattia, jonka väkevyys on 4-16-kertainen, edullisesti noin 8-kertainen verrattuna heraan, jolloin sen heraproteiinipitoisuus on edullisesti noin 2-7 paino/tilavuus-%, edullisesti noin 4 paino/tilavuus-%.
- 20 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa a) käytetään sulfiitti-ioneja muodostavana reagenssina alkalimetallin tai maa-alkalimetallin sulfiittia, vetysulfiittia ja/tai metabisulfiittia, edullisesti natriumsulfiittia, natriumvetysulfiittia ja/tai natriummetabisulfiittia, edullisimmin natriumvetysulfiittia.
- 25 4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa a) sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin pitoisuus on sellainen, että sulfiitin konsentraatio sulfitolyysiseoksessa on välillä noin 0,02-0,20 M, edullisesti 0,05-0,1 M.
- 30 5. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa a) käytetään elintarvikelaatuisena hapettavana yhdisteenä elintarvikelaatuista peroksidiyhdistettä ja/tai halogenaattia, edullisesti vastaavasti kalsiumperoksidia  $\text{CaO}_2$  ja/tai kaliumbromaattia  $\text{KBrO}_3$ .
- 35 6. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa a) elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen pitoisuus on välillä noin  $0,01 \cdot O_{\text{akt.}}$  -  $0,15 \cdot O_{\text{akt.}}$  paino/tilavuus-%, jossa  $O_{\text{akt.}}$  tarkoittaa yhdisteen aktiivisen hapen pitoisuutta.

7. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaihe a) suoritetaan pH:ssa noin 5,0-8,5.

8. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että  
5 vaihe a) suoritetaan lämpötilassa noin 30-50°C.

9. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaihe a) suoritetaan kahdessa alivaiheessa siten, että:

- 10 a<sub>1</sub>) saatetaan hera tai sen konsentraatti kosketukseen sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa heraproteiinin sulfitolysoimiseksi ja  
a<sub>2</sub>) saatetaan vaiheen a<sub>1</sub>) sulfitolysoitu heraproteiini kosketukseen elintarvikelaatuisen hapettavan yhdisteen kanssa sulfitolysoidun heraproteiinin hapettamiseksi.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että alivaihe a<sub>1</sub>)  
15 suoritetaan pH:ssa noin 6,0-7,5, edullisesti pH:ssa 6,5-7,0.

11. Patenttivaatimuksen 9 tai 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että alivaiheen a<sub>1</sub>) sulfitolyysi suoritetaan noin 10-50 minuutissa.

20 12. Jonkin patenttivaatimuksen 9-11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että alivaihe a<sub>2</sub>) suoritetaan pH:ssa noin 5,0-7,0, edullisesti pH:ssa noin 5,5-6,5.

13. Jonkin patenttivaatimuksen 9-12 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että alivaiheen a<sub>2</sub>) hapetus suoritetaan noin 15-60 minuutissa.

25 14. Jonkin patenttivaatimuksen 9-13 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että alivaiheessa a<sub>1</sub>) ja a<sub>2</sub>) käytetään oleellisesti samaa eli vaiheen a) lämpötilaa.

30 15. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa b) saostetaan sulfitolysoitu ja hapetettu heraproteiini käyttämällä pH-arvoa noin 2,5-6,5, edullisesti pH-arvoa 3,0-5,0.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa b) saostetaan lämpötilassa 25-55°C, edullisesti lämpötilassa 30-50°C.

35

17. Patenttivaatimuksen 15 tai 16 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa b) käytetään hidasta pH-arvon säätämistä mainittuun saostus-pH-arvoon.

18. Patenttivaatimuksen 15, 16 tai 17 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että pH-arvon säätö siirryttäessä vaiheen a) sulfitolyysistä ja hapetuksesta vaiheen b) saostukseen tapahtuu 10-40 minuutin aikana.
- 5 19. Jonkin patenttivaatimuksen 15-18 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheen b) pH:n säädön jälkeen suoritetaan seoksen sekoitus, joka edullisesti kestää noin 10-60 min.
- 10 20. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheen b) saostus tehdään vuorotellen vähintään kahdessa astiassa, edullisesti siten, että sekä vaiheen a) sulfitolyysi ja hapetus että vaiheen b) saostus tehdään mainitussa vähintään kahdessa reaktorissa vuorotellen, jolloin toista reaktoria tyhjennetään ja täytetään uudelleen, kun toisessa reaktorissa suoritetaan sulfitolyysi, hapetus ja saostaminen.
- 15 21. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa c) konsentroidaan ja pestään vaiheessa b) saostettu sulfitolysoitu ja hape-tettu heraproteiini, edullisesti mikrosuodatuksen avulla.
- 20 22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheen c) mikrosuodatuksen suodokseen proteiinit konsentroidaan ja pestään ultrasuodatta-malla sekä erotetaan suihkekuivauksella.
- 25 23. Patenttivaatimuksen 21 tai 22 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vai-heessa c) saostekonsentraatista poistetaan vesi sentrifugoimalla tai suodattamalla, edullisesti nauha- tai rumpusuodattimella, jolloin tuloksena saadaan proteiinitahnaa.
- 30 24. Patenttivaatimuksen 23 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa c) proteiinitahnan pH nostetaan arvoon 6-8 emäksellä tai emässeoksella, joka edulli-sesti on NaOH tai NaOH:n,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :n ja KOH:n seos, jolloin  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ :n määrä edullisesti on sellainen, että se korvaa vähintään alkuperäisen Ca:n määrän.
- 35 25. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että vaiheessa c) suoritetaan saostekonsentraatin kuivaus suihkekuivauksella, jolloin saostekonsent-raatin pH on edullisesti säädetty sitä ennen arvoon 6-8 emäksellä tai emässeoksella, joka edullisesti on sama kuin mitä patenttivaatimuksessa 24 on ilmoitettu.

Patentkrav

1. Förfarande för isolering av proteiner ur vassla, där
  - a) vassla eller ett koncentrat därav, ett sulfittjon bildande reagens och en oxiderande förening bringas i kontakt för sulfonering, mao. sulfitolys och oxidation av vassleproteinet,
  - b) det sulfitolyserade och oxiderade vassleproteinet utfälles ur vasslan eller ett koncentrat därav vid sur pH och
  - c) det utfällda sulfitolyserade och oxiderade vassleproteinet tillvaratages ur produktblandningen och utsättes eventuellt för efterbehandling,
- 10 **kännetecknat** av att i steg a) användes som oxidationsmedel en oxiderande förening av livsmedelskvalitet väsentligen utan katalysator och en temperatur mellan 25 och 55°C, vid vilken temperatur den oxiderande föreningen omsättes direkt med det sulfitolyserade vassleproteinet.
- 15 2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att i steg a) användes ett vasslekoncentrat, vars koncentration är 4-16-faldig, företrädesvis cirka 8-faldig i jämförelse med vasslan, varvid dess vassleproteinhalt är företrädesvis cirka 2-7 vikt/volym-%, företrädesvis cirka 4 vikt/volym-%.
- 20 3. Förfarande enligt patentkrav 1 eller 2, **kännetecknat** av att i steg a) användes som sulfittjonbildande reagens ett sulfitt, vätesulfitt och/eller metabisulfitt av en alkalimetall eller en alkalisk jordartsmetall, företrädesvis natriumsulfitt, natriumvätesulfitt och/eller natriummetabisulfitt, helst natriumvätesulfitt.
- 25 4. Förfarande enligt patentkrav 1, 2 eller 3, **kännetecknat** av att i steg a) är koncentrationen av det sulfittjonbildande reagentet sådan, att sulfittkoncentrationen i sulfitolysblandningen är mellan cirka 0,02 och 0,20 M, företrädesvis 0,05-0,1 M.
- 30 5. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att i steg a) används som den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet en peroxidförening och/eller ett halogenat av livsmedelskvalitet, företrädesvis respektive kalciumperoxid  $\text{CaO}_2$  och/eller kaliumbromat  $\text{KBrO}_3$ .
- 35 6. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att i steg a) är halten av den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet mellan cirka  $0,01 \cdot O_{\text{akt}}$  -  $0,15 \cdot O_{\text{akt}}$  vikt/volym-%, där  $O_{\text{akt}}$  betecknar halten aktivt syre hos föreningen.

7. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att steg a) genomförs vid ett pH-värde av cirka 5,0-8,5.
8. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att  
5 steg a) genomförs vid en temperatur av cirka 30-50°C.
9. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att steg a) genomförs i två understeg så, att:  
a<sub>1</sub>) vasslan eller ett koncentrat därav bringas i kontakt med det sulfitjonbildande  
10 reagenset för sulfitolysering av vassleproteinet och  
a<sub>2</sub>) det i steg a<sub>1</sub>) sulfitolyserade vassleproteinet bringas i kontakt med den oxiderande föreningen av livsmedelskvalitet för oxidering av det sulfitolyserade vassleproteinet.
- 15 10. Förfarande enligt patentkrav 9, **kännetecknat** av att understeg a<sub>1</sub>) genomförs i ett pH av cirka 6,0-7,5, företrädesvis ett pH av 6,5-7,0.
11. Förfarande enligt patentkrav 9 eller 10, **kännetecknat** av att sulfitolyseringen i understeg a<sub>1</sub>) genomförs på 10-50 minuter.  
20
12. Förfarande enligt något av patentkraven 9-11, **kännetecknat** av att understeg a<sub>2</sub>) genomförs vid ett pH av cirka 5,0-7,0, företrädesvis ett pH av cirka 5,5-6,5.
13. Förfarande enligt något av patentkraven 9-12, **kännetecknat** av att oxideringen i understeg a<sub>2</sub>) genomförs på 15-60 minuter.  
25
14. Förfarande enligt något av patentkraven 9-13, **kännetecknat** av att i stegen a<sub>1</sub>) och a<sub>2</sub>) användes väsentligen samma, mao. stegets a) temperatur.
15. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att i steg b) utfälles det sulfitolyserade och oxiderade vassleproteinet genom användning av ett pH-värde av cirka 2,5-6,5, företrädesvis ett pH-värde av 3,0-5,0.  
30
16. Förfarande enligt patentkrav 15, **kännetecknat** av att i steg b) genomförs utfällningen vid temperaturen 25-55°C, företrädesvis temperaturen 30-50°C.  
35
17. Förfarande enligt patentkravet 15 eller 16, **kännetecknat** av att i steg b) används en långsam reglering av pH-värdet till nämnda pH-värde för utfällningen.

18. Förfarande enligt patentkrav 15, 16 eller 17, **kännetecknat** av att regleringen av pH-värdet vid övergång från stegets a) sulfitolys och oxidering till stegets b) utfällning sker under 10-40 minuter.
- 5 19. Förfarande enligt något av patentkraven 15-18, **kännetecknat** av att efter stegets b) reglering av pH-värde genomförs en blandning, som företrädesvis räcker i 10-60 min.
- 10 20. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att stegets b) utfällning genomförs turvis i åtminstone två kärl, företrädesvis så, att såväl stegets a) sulfitolys och oxidation som stegets b) utfällning genomförs i nämnda åtminstone två reaktorer turvis, varvid den ena reaktorn tömmes och återfylls, då den andra reaktorn utnyttjas för sulfitolys, oxidation och utfällning.
- 15 21. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, **kännetecknat** av att i steg c) koncentreras och tvättas det i steg b) utfällda sulfitolyserade och oxiderade vassleproteinet, företrädesvis medelst mikrofiltrering.
- 20 22. Förfarande enligt patentkrav 21, **kännetecknat** av att proteinerna hos det filtrat, som erhållits ur stegets c) mikrofiltrering, koncentreras och tvättas medelst ultrafiltrering och separeras medelst spraytorkning.
- 25 23. Förfarande enligt patentkrav 21 eller 22, **kännetecknat** av att i steg c) avlägsnas vattnet ur utfällningskoncentratet genom centrifugering och filtrering, företrädesvis med hjälp av ett band- eller trumfilter, varvid proteinpasta erhålls som produkt.
- 30 24. Förfarande enligt patentkrav 23, **kännetecknat** av att i steg c) höjes proteinpastans pH till ett värde av 6-8 medelst en bas eller basblandning, som företrädesvis är NaOH eller en blandning av NaOH,  $\text{Ca(OH)}_2$  eller KOH, varvid mängden  $\text{Ca(OH)}_2$  är sådan, att den ersätter åtminstone den ursprungliga mängden Ca.
- 35 25. Förfarande enligt patentkrav 21, **kännetecknat** av att i steg c) genomförs en torkning av fällningskoncentratet medelst spraytorkning, varvid pH-värdet hos fällningskoncentratet företrädesvis därförinnan reglerats till ett värde av 6-8 med en bas eller basblandning, som företrädesvis är densamma som angetts i patentkravet 24.