



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 113181

(13) C2

(51) МПК

A23J 1/14 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

A23J 3/16 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2014 01675	(72) Винахідник(и):	Внуковські Пьотр (PL/NL), Смолдерс Герардус Йоханес Франсіскус (NL), Веерман Сесіль (NL)
(22) Дата подання заявки:	05.07.2012	(73) Власник(и):	ДСМ АйПі АСЕТС Б.В., Het Overloon 1, NL-6411 TE Heerlen, The Netherlands (NL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	26.12.2016	(74) Представник:	Слободянюк Алла Василівна, реєстр. №25
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	11175743.1	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 02060273 A1, 08.08.2002 JP 58224645 A, 27.12.1983 WO 03030652 A1, 17.04.2003 US 2003060607 A1, 27.03.2003 WO 0145521 A2, 28.06.2001 UA 29197 A, 16.10.2000
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	28.07.2011		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.06.2014, Бюл.№ 12		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	26.12.2016, Бюл.№ 24		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2012/063134, 05.07.2012		

(54) ВИДІЛЕННЯ БІЛКА З ОЛІЄВМИСНОГО НАСІННЯ

(57) Реферат:

Спосіб виділення нативного білка з борошна насіння олійної культури або макухи насіння олійної культури, який передбачає наступні етапи:

- екстрагування борошна насіння олійної культури водою, щоб одержати водний розчин;
- концентрування водного екстракту до концентрованого водного розчину, який містить від 5 до 30 % мас. білка;
- додавання водорозчинного розчинника до концентрованого водного розчину, щоб одержати преципітат білка; при цьому водорозчинним розчинником є етанол, який додається в кінцевій концентрації від 60 до 80 об. %; і
- відділення преципітату білка від водної фракції.

UA 113181 C2

Галузь техніки

Даний винахід відноситься до способу виділення білка з олієвмісного насіння, такого, як насіння рапсу, насіння соняшника, кокосів або бобів сої.

Рівень техніки

5 Присутню в олієвмісному насінні (насінні олійних рослин) олію зазвичай екстрагують гексаном. Однак комбінація екстракції й процесу видалення розчинника може викликати денатурацію білків. Це приводить до конформаційного стану, у якому білки не проявляють технологічної функціональності, необхідної для використання білків у широкому спектрі харчових технологій. Крім того, цей розчинник виявився в центрі уваги з погляду безпеки й впливу на навколишнє середовище (гексан внесений до списку небезпечних забруднювачів повітря).

Щоб екстрагувати білкову фракцію з олієвмісному насінні, застосовують кілька методик екстракції. Можуть бути згадані екстракція водою або лугом, розчинами хлориду натрію й гексаметифосфату натрію. Спосіб лужної екстракції призводить до максимального виходу, але пов'язаний з ризиком потемніння продукту й негативно впливає на смак або запах.

15 Як приклад більш детально обговоримо насіння рапсу. Насіння рапсу - один з найбільш значимих видів олієвмісного насіння у світі (третє місце після соєвої й пальмової олій). Насіння рапсу містять у великій кількості олію (30-45 %) і білок (20-30 %). Однак у насінні рапсу присутні також антипоживні сполуки, такі як глюкозинолати, поліфеноли й фітинова кислота. Таблиця 1 показує типову кількість цих складових у насінні рапсу.

Таблиця 1. Антипоживні сполуки в насінні рапсу

Глюкозинолати	10-20 мкМоль/кг
Синапін	1-1,5 % (усього фенольних сполук (1-3 %))
Фітинова кислота	1-2 %

Для екстракції білків з насіння рапсу слід розв'язати наступні проблеми:

25 - присутність фенольних сполук, які можуть бути причиною темного кольору після обробки й підвищення інтенсивності флейвора й запаху. Канола (насіння рапсу) містить від 10-30 раз більше фенольних сполук у порівнянні із соєвими бобами (такі як синапін і таніни). Під дією окислення ці сполуки можуть привести до появи темного кольору. Особливо жорсткі лужні умови ведуть до швидкого окислення фенолів до так званих хінонів, які потім можуть реагувати з білками (даючи темний колір). Ці фенольні сполуки можуть частково зв'язувати білки (див. патент США US 6905713);

30 - присутність фітату, який може діяти як хелатуючий агент у тілі людини, і забезпечувати зменшення біодоступності деяких металів;

35 - присутність глюкозинолатів. Гідроліз глюкозинолатів може призвести до утворення токсичних продуктів. Глюкозинолати знижують також смакові якості рапсового борошна.

Сутність винаходу

Даний винахід пропонує поліпшений спосіб екстракції й виділення білка з борошна олієвмісного насіння, у якому виділення відбувається шляхом додавання достатньої кількості водорозчинного розчинника, такого, як етанол, до водного розчину, який містить білок, екстрагований з борошна, за допомогою чого наявний білок осаджується. Щоб зберегти властивості нативних білків, борошно, яке використовується для екстракції білків, добувають бажано з олієвмісного насіння, не обробленого гексаном.

40 На вибір цей преципітат може бути далі очищений промиванням водорозчинним розчинником, наприклад, етанолом. Ізолят білка може бути висушений, використовуючи придатний спосіб висушування.

45 Відповідно до одного об'єкту винаходу, пропонується спосіб виділення білка з борошна або олійної макухи, який передбачає наступні етапи:

- екстрагування борошна водою, щоб одержати водний розчин;

50 - концентрування водного екстракту до водного розчину, що містить від 5 до 30 % мас. білка, бажано від 10 до 30 % мас. білка;

- додавання водорозчинного розчинника до концентрованого водного розчину, щоб одержати преципітат білка; і

- відділення преципітату білка від водної фракції.

55 Бажано спосіб запропонований винаходом передбачає додатковий етап промивання преципітату білка. Спосіб запропонований винаходом на вибір передбачає додатковий етап висушування преципітату білка. Бажано в способі запропонованому винаходом після етапу екстракції й до додавання водорозчинного розчинника водний розчин або концентрований

водний розчин піддають діалізації, бажано, шляхом використання УФ (ультрафільтрації). Бажано розчинні вуглеводи, глюкозинолати або їх похідні, фітати або поліфенольні (або фенольні) сполуки або комбінація одного або більш із цих сполук видаляють із водного розчину або концентрованого водного розчину. Відповідно до одного варіанту реалізації винаходу

5 діалізація має місце до, під час або після концентрування водного екстракту. Згідно з більш кращим варіантом реалізації, водорозчинним розчинником є метанол, етанол або ацетон, бажано етанол. Борошно, яке використовують у способі запропонованому винаходом, може, наприклад, бути борошном з насіння рапсу, соняшника або сої. Бажано виділений білок

10 винаходу має більш високий вміст нативного білка, ніж білок, отриманий з борошна, обробленого гексаном, або сучасними способами екстракції, які мають кращу технологічну функціональність для виділеного білка відповідно до винаходу. Ця функціональність забезпечує переваги у використанні білків у широкому спектрі харчових технологій.

Даний винахід також надає виділений білок або композицію білків, яка має:

- вміст білка щонайменше 80 % мас., бажано щонайменше 85 % мас., більш бажано

15 щонайменше 90 % мас., і найбільше бажано між 92 і 99 % мас. (за сухою речовиною);

- вміст етанолу менше, ніж 0,2 % мас., бажано менше, ніж 0,1 % мас. (за сухою речовиною);
- вміст етанолу більше, ніж 0,001 % мас., бажано більше, ніж 0,01 % мас. (за сухою речовиною); і
- вміст фенольних сполук менше, ніж 0,1 % мас., бажано менше, ніж 0,05 % мас., ще краще,

20 менше, ніж 0,02 % мас. (за сухою речовиною), виражений в еквівалентах гірчичної кислоти.

Якщо ізолят білка або композиція білків містить білок насіння рапсу, композиція має вміст фенольних сполук менше, ніж 0,1 % мас., бажано менше, ніж 0,05 % мас., ще краще, менше, ніж 0,02 % мас. (за сухою речовиною) виражений в еквівалентах гірчичної кислоти. Якщо ізолят білка або композиція білків містить білок сої, композиція має вміст фенольних сполук менше,

25 ніж 0,1 % мас., бажано менше, ніж 0,05 % мас., ще краще, менше, ніж 0,02 % мас. (за сухою речовиною) виражений в еквівалентах гірчичної кислоти. Якщо ізолят білка або композиція білків містить білок соняшника, композиція має вміст фенольних сполук менше, ніж 0,1 % мас., бажано менше, ніж 0,05 % мас., ще краще, менше, ніж 0,02 % мас. (за сухою речовиною), виражений в еквівалентах гірчичної кислоти.

30 Бажано ізолят білка або композиція білків запропонована винаходом має вміст глюкозинолатів менше, ніж 10 мкмоль/г, бажано менше, ніж 1 мкмоль/г (за сухою речовиною).

У цілому, ізолят білка або композиція білків запропонована винаходом будуть мати вміст ліпідів від 2 до 15 % мас., бажано від 2 до 10 % мас., більш бажано від 2 до 8 % мас. (за сухою речовиною) у випадку білка насіння рапсу або соняшника або від 2 до 20 % мас., більш бажано

35 від 2 до 15 % мас. (за сухою речовиною) у випадку соєвого білка.

Ізолят білка або композиція білків запропонована винаходом буде бажано мати вміст фітату ($P \times 3,5$) менше, ніж 0,5 % мас., бажано менше, ніж 0,2 % мас. (за сухою речовиною).

Ізолят білка або композиція білків запропонована винаходом буде бажано мати розчинність щонайменше 30 PA%, бажано щонайменше 50 PA%, більш бажано щонайменше 60 PA%,

40 навіть більш бажано щонайменше 70 PA% і найбільше бажано щонайменше 75 PA%.

Ізолят білка або композиція білків запропонована винаходом бажано має вміст сухої речовини щонайменше 70 % мас., бажано щонайменше 80 % мас., більш бажано щонайменше 85 % мас., навіть більш бажано щонайменше 90 % мас., ще більш бажано щонайменше 91 % мас., навіть ще більш бажано має вміст сухої речовини від 92 до 99 % мас. і найбільше бажано

45 від 93 до 98 % мас.

Ізолят білка або композиція білків запропонована винаходом бажано містить білок насіння рапсу, насіння соняшника або сої. У випадку насіння рапсу ізолят білка або композиція білків запропонована винаходом буде бажано містити білок 2S і білок 12S, присутні в співвідношенні від 1:6 до 6:1, бажано в співвідношенні від 1:2 до 2:1 (мас./мас. за сухою речовиною).

50 Для трьох комерційно доступних ізолятів білків, які не виробляються згідно з винаходом, визначена розчинність становить 69 PA%, 55 PA% і 67 PA%, відповідно.

Докладний опис винаходу

Ізоляти або концентрати білка, отримані з рослин або олієвмісного насіння і призначені для споживання, мають одну основну проблему для промислових переробників або укладачів

55 рецептур, а саме, наявність антипоживних факторів, таких, як фенольні сполуки, які присутні у вихідному матеріалі. Фенольні сполуки звичайно зустрічаються в олієвмісному насінні, подібному до насіння сої, соняшника й рапсу й відповідальні за колір і неприємний присмак ізолятів білка. Крім того, є необхідність видаляти або знижувати вміст небажаних сполук, подібних до фенольних сполук, до слідового рівня в кінцевому продукті, особливо якщо він

60 призначений для споживання (людиною).

Одним зі способів видалення фенольних сполук із рецептур, які містять білок, є його промивання водорозчинними розчинниками, такими, як метанол, етанол, ацетон тощо. Можливий інший підхід, наприклад, попередня обробка, така, як застосування етапу вимивання розчинника до екстракції білків або постобробка, така, як промивання ізолятів білків після екстракції або виділення.

Спосіб запропонований винаходом передбачає включення обробки розчинником, що має місце після екстракції білків, але до виділення ізолятів білка. Винахідники виявили, що в цілому білки можуть бути очищені від небажаних сполук, таких, як фенольні сполуки, шляхом перенесення білка у водний розчин. Бажано, білок очищають від низькомолекулярних сполук, наприклад, вуглеводів або інших сполук, наприклад, частини фенольних сполук, які присутні у неочищеному екстракті. Таке очищення може, наприклад, бути досягнуте діалізацією під час УФ (етап ультрафільтрації). Винахідники спостерігали, що істотна частина фенольних сполук, які присутні у неочищеному екстракті, може бути вилучена, наприклад, УФ, але не всі. Проте, є деякі фенольні сполуки, які залишаються в ізоляті білка, які не можуть бути вилучені, наприклад, діалізацією. З літератури відомо, що це явище спостерігали на соняшнику.

Можливе пояснення може полягати в тому, що ці фенольні сполуки інкорпоровані в четвертинні структури білка й приєднані до гідрофобних епітопів білків слабкими силами притягання. Відповідно до даного винаходу, білки бажано підтримуються у вигляді нативних або неденатурованих білків підбиранням придатних умов переробки до застосування розчинника. У цілому, важливо запобігати формуванню необоротних комплексів фенольних сполук із білками. Ці комплекси можуть утворюватися за деяких умов, таких, як присутність розчиненого кисню, pH вище 8 і/або підвищена температура (вище 60°C).

Виділення білка згідно з винаходом може бути досягнуте додаванням водорозчинного розчинника, наприклад, етанолу, до водного розчину, бажано під час перемішування. Сили притягання між фенольними сполуками й білками будуть слабшати в присутності етанолу, роблячи можливим вивільнення фенольних сполук із амінокислотних ланцюжків. Ці фенольні сполуки будуть послідовно дифундувати в основну масу рідкої фази. Щоб мінімізувати ризик необоротної денатурації, температуру бажано підтримують в інтервалі від 0 до 30°C, бажано від 0 до 20°C. Однак, даний винахід не має вичерпного пояснення або гіпотези, яка тільки формулюється винахідниками, скоріше, щоб розробити легко зрозумілі етапи способу, ніж для того, щоб обмежити рамки даного винаходу.

Щоб досягти цього ефекту, наприклад, для білків насіння рапсу, вміст етанолу в кінцевій вихідній рідині бажано становить між 60 і 80 об. %, більш бажано між 65 і 75 об. %. Якщо цей вміст є істотно нижчим, очищення стає менш ефективним. Якщо цей вміст вище, білок може піддаватися більш швидкій денатурації, і ефективність очищення буде менше оптимальною.

У міжнародній заявці 02/060273 передбачається, що піддавання білків соняшника дії розчину етанолу в концентрації вище 40 % може привести до денатурації білків. Заявники несподівано виявили, що білки насіння рапсу, виділені з розчину етанолу 70 об. % і потім висушені, залишаються нативними білками й зберігають свої функціональні властивості, важливі для харчових технологій, наприклад, здатність до піноутворення, розчинність, здатність зв'язувати воду тощо.

Спосіб запропонований винаходом, якщо він використовується для насіння соняшника, надає ізоляти білка з високим виходом, високої чистоти й з низьким вмістом фенольних сполук. Цей ізолят білка також проявляє гарні функціональні властивості, підтримуючи наше пояснення або гіпотезу.

У межах даного опису й формули винаходу, яка його супроводжує, слова "містити" і "включати" і варіації, такі, як "містить", "утримує", "включає" і "який включає", слід інтерпретувати як не обмежуючі. Тобто ці слова призначені для вираження можливого включення інших елементів або цілих систем, окремо не перерахованих, якщо це дозволяє контекст.

Артикли "a" і "an" використовують у даному документі, щоб позначити одиницю або більше, ніж один (тобто один або щонайменше один) граматичний об'єкт артикля. Приводячи приклад, "an element" може означати один елемент або більше, ніж один елемент.

Насіння рапсу (*Brassica napus*), також відоме як рапс, олійний рапс, суріпиця та ін. (і у випадку окремої групи сортів, канола) – який цвіте ясно-жовтими квітками є представником родини Brassicaceae (родина Хрестоцвіті або Капустяні) (Wanasundara, 2011). Білки, які присутні в насінні рапсу, містять білок 2S (мономерний білок, наприклад, напін) і білок 12S (гексамерний білок, наприклад, круциферин). У нативному насінні утримується близько 7 % мас. білка 2S, 2 % мас. 7S і 12 % мас. 12S.

Культурний соняшник (*Helianthus annuus* L.) – один з 67 видів роду *Helianthus* і представник

родини Складноцвіті (Айстрові). Білки, які є присутніми в соняшнику, складаються із двох основних класів, глобуліни 11S (наприклад, геліантинін) і альбуміни соняшника 2S. У насінні соняшника близько 60 % білків складаються з білка 11S, у той час як на частку альбумінів соняшника 2S доводиться близько 20 % білків.

5 Соеві боби містять близько 40 % білка за сухою речовиною (СР). Ґрунтуючись на коефіцієнтах їх седиментації, соєві білки можуть бути підрозділені на фракції 2S (13-18 %), 7S (30-46 %), 11S (36-53 %) і 15S (0-4 %). Фракції 11S і 15S складаються із гліциніну й полімерів гліциніну відповідно. Більшість фракції 7S становить β -конгліцинін. Фракція 2S складається з інгібіторів трипсину Бовмана-Бірка й Куніца, цитохрому с і α -конгліциніну.

10 В результаті переробки насіння рапсу на олійну продукцію отримують рапсове борошно або олійну макуху як побічний продукт розмелювання, віджиму й, на вибір, екстракції олії з олієвмісного насіння рапсу, який має, в основному, форму борошна. Під "олійною макухою" розуміють продукт після розмелювання й віджиму. Під "борошном" розуміють, що, щонайменше частина олії вилучена, наприклад, екстракцією, з олійної макухи. Олійна макуха й борошняний

15 побічний продукт мають високий вміст білків. Інші види олієвмісного насіння дають аналогічні олійну макуху й борошно як побічний продукт.

Ціль даного винаходу – надати спосіб виділення білка з борошна або олійної макухи, які містять білок і поліфенольні сполуки. Тому спосіб даного винаходу передбачає наступні етапи:

- екстрагування борошна водою, щоб одержати водний розчин;
- 20 - концентрування водного екстракту до водного розчину, який містить від 5 до 30 % мас. білка, бажано від 10 до 30 % мас. білка;
- додавання водорозчинного розчинника до концентрованого водного розчину, щоб одержати преципітат білка; і
- відділення преципітату білка від водної фракції.

25 Бажано спосіб може, крім того, включати один або комбінацію додаткових або наступних етапів:

- промивання преципітату білка; і
- висушування преципітату білка.

У кращому варіанті реалізації винаходу після етапу екстракції й до додавання водорозчинного розчинника водний розчин або концентрований водний розчин піддають діалізації, бажано, шляхом використання УФ (ультрафільтрації). Під час цього етапу діалізації розчинні вуглеводи, глюкозинолати або їх похідні, фітати або поліфенольні сполуки або комбінації одного або більше з поміж цих сполук можуть бути вилучені з водного розчину або концентрованого водного розчину. Ця діалізація має місце до, під час або після концентрування водного екстракту. Діалізація може бути виконана окремо від етапу концентрування або може бути об'єднана з етапом концентрування, наприклад, шляхом використання УФ.

Водорозчинним розчинником бажано є метанол, етанол або ацетон, більш бажано етанол. Бажано рідка фракція після відділення містить поліфенольні сполуки.

40 Даний винахід розкриває спосіб одержання виділеного білка або композиції білків шляхом, який є економічно привабливим і в той же час, який не завдає шкоди навколишньому середовищу внаслідок використання регенованих сполук, таких, як вода й водорозчинні розчинники, наприклад, етанол, що може обумовити виробництво білкових продуктів харчової кондиції.

45 Висушений преципітат білка або ізолят білка має вміст білка щонайменше 80 % мас. Вміст білка визначають за основою сухої речовини методом К'ельдаля. Ізолятом білка є ізольована фракція борошна олієвмісного насіння, у якому вміст білка за сухою речовиною у ізоляті більше або рівне 80 % мас., бажано щонайменше 90 % мас. Типово, вміст білка в ізоляті білка за сухою речовиною становить від 92 до 99 % мас. Типово, небілковий вміст ізолята білка включає

50 небілкові сполуки, такі, як антипоживні речовини, жири, волокна й інші компоненти. Приклади борошна олієвмісного насіння включають макуху насіння, знежирене борошно або збагачене білком борошно. Борошно є борошном олієвмісного насіння, такого, як насіння рапсу, сої, соняшника кокоса, традиційного льону, олійного льону сорту Лінола або гірчиці, краще, якщо борошно є борошном насіння рапсу. Хоча спосіб запропонований винаходом розкритий тут

55 більш детально для борошна з насіння рапсу, даний винахід може також бути застосований до борошна з інших видів олієвмісного насіння. Борошно може бути будь-яким борошном, отриманим у результаті видалення олії з насіння, з різним рівнем нативного (неденатурованого) білка, одержаного, наприклад, способами гарячої або холодної олійної екструзії. Під нативним (неденатурованим) білком розуміють білок, який у великій мірі зберіг свої функціональні

60 властивості, які є важливими для застосування в харчовій промисловості, наприклад:

- розчинність у водних розчинах,
- здатність зв'язувати воду,
- здатність зв'язувати жир і/або
- здатність утворювати піну.

Борошно є побічним продуктом пресування або екстракції олії з олієвмісного насіння або олійної макухи. Продукт отриманий способом запропонованим винаходом може бути використаний для споживання людиною. Вигідно, що умови в способі, використаному, щоб виділити олію з олієвмісного насіння, власне не призводять до денатурації білка, який присутній в олієвмісному насінні або борошні. Бажано підбирають умови, які призводять у результаті до збереження нативності й функціональності білків у борошні. Прикладом м'яких умов служить холодне пресування олієвмісного насіння, наприклад, насіння рапсу. М'які умови під час виділення олії, також, як умови даного способу, дадуть у результаті білковий продукт, який має високу функціональність і, отже, високу цінність для споживання людиною. Установлено, що ізолят білків, отриманий способом запропонованим даним винаходом, є нативним (неденатурованим) білком. Бажано спосіб запропонований винаходом призводить до одержання білка, у якому вміст нативного білка в отриманому білку є істотним. Вміст нативного білка є фракцією нативного білка, присутнього в білку (в % мас.).

Придатними умовами для водної екстракції білка з борошна є температура між 8 і 80°C, і бажано між 10 і 55°C. У цілому, рН перебуває між 5 і 10, бажано між 6 і 8.

Екстракцію білка з борошна олієвмісного насіння проводять будь-яким звичайним способом, який узгоджується із проведенням безперервної екстракції білка з борошна олієвмісного насіння, наприклад, пропусканням суміші борошна олієвмісного насіння і харчового водного розчину через трубку, яка має довжину, і за інтенсивності потоку протягом періоду перебування, достатнього, щоб здійснити бажану екстракцію.

Як варіант, екстракція може бути здійснена в змішувачі, у який порціями або безперервно подають суміш борошна олієвмісного насіння і водний розчин, і з якого порціями або безперервно видаляють водний розчин білка. На додачу, процедура може бути здійснена напівбезперервним способом, еквівалентним до безперервного, у якому водний розчин суміші борошна олієвмісного насіння подають у перший змішувач, у якому здійснюють екстракцію, щоб утворювати водний розчин білка, у той час, як водний розчин білка безперервно подають із другого змішувача для проведення етапу відділення залишкового борошна, описаного нижче. Коли водний розчин білка сформований у першій ємкості, і друга ємкість звільнена від водного розчину білка, перша ємкість потім стає другою ємкістю і так далі.

Водна фаза або розчин, отриманий на етапі екстракції, може бути відділений від залишкового борошна будь-яким придатним способом, наприклад, застосуванням фільтрації й/або центрифугування, щоб вилучити залишкове борошно. Відділене залишкове борошно може бути висушене.

Водна фаза або водний розчин можуть бути використані як такі на наступному етапі (додавання водорозчинного розчинника, наприклад, етанолу) або бажано можуть бути концентровані до наступного етапу додавання водорозчинного розчинника, наприклад, етанолу. Етап концентрування може бути здійснений будь-яким придатним способом, який узгоджується з (напів)безперервним або періодичним (переривчастим) способом, наприклад, застосуванням будь-якої придатної технології з використанням селективної мембрани, наприклад, ультрафільтрації (ГА), щоб надати можливість одержати бажаний ступінь концентрації водного розчину білка. Бажано, діалізація може бути здійснена до, після або під час етапу концентрування. Ця діалізація має місце після етапу екстракції й до додавання водорозчинного розчинника. УФ може бути використана для діалізації. Так, УФ може бути використана для діалізації, також як для концентрування, УФ може бути використана для діалізації, і етап концентрування проводять окремо. Використанням УФ для діалізації більшість розчинних вуглеводів і АПФ (антипоживних факторів, таких, як глюकोзинолати та їх похідні, фітати й більшість поліфенольних сполук), присутніх у водному розчині, переважно можуть бути вилучені.

Етап концентрування може бути здійснений за будь-якої придатної температури, в основному, від 20 до 80°C, і протягом часу, необхідного, щоб досягти бажаного ступеня концентрування. Температура й інші використані умови певною мірою залежать, наприклад, від мембранного устаткування, яке використовується, щоб вплинути на концентрування й бажану концентрацію білка в розчині.

На етапі, на якому додають водорозчинний розчинник, наприклад етанол, бажано використовують водорозчинний розчинник, що містить щонайменше 90 об. % розчинника, бажано щонайменше 92 об. % розчинника. Так, на етапі, на якому додають етанол, бажано

використовують щонайменше 90 об. % етанолу, бажано щонайменше 92 об. %. Додавання водорозчинного розчинника, наприклад етанолу, необхідно, щоб одержати концентрацію водорозчинного розчинника, наприклад, етанолу, яка є достатньо високою, щоб осадити наявний білок. Концентрація близько 70 об. % етанолу є достатньою, щоб осадити білок.

5 Розділення преципітату білка й рідкої фракції може бути здійснене в будь-якому придатному сепараторі, наприклад, з використанням фільтрації й/або центрифугування. Рідка фракція буде містити в основному антипоживні сполуки (такі, як фітати, фенольні сполуки й глюкозинолати) і цукри, якщо як на вході використовують борошно з насіння рапсу. Якщо використовують етап

діафільтрації, як описано раніше, можуть бути присутнім тільки залишки цих сполук. Преципітат

10 в основному містить білки 2S (напіни або альбуміни) і білки 12S (круциферини або глобуліни), якщо джерелом його походження є насіння рапсу.

Преципітат може бути промитий, наприклад, водою/водорозчинним розчинником, наприклад, розчином етанолу, що містять менше, ніж 70 об. % водорозчинного розчинника, який бажано містять від 50 до 70 % мас. водорозчинного розчинника, більш бажано від 50 до 70 об. % етанолу, навіть ще краще від 50 до 65 об. % етанолу й найкраще від 50 до 60 об. % етанолу.

Преципітат може бути висушений, щоб вилучити залишковий водорозчинний розчинник, наприклад, етанол, до рівня бажано менше, ніж 0,2 % мас., бажано менше, ніж 0,1 % мас. водорозчинного розчинника, наприклад, етанолу. В основному, ізолят білка або композиція

20 білків, отримана способом запропонованим даним винаходом, має чистоту більше, ніж 90 % мас. (за сухою речовиною). (Полі)фенольні сполуки присутні в концентрації менше, ніж 0,1 % мас., бажано менше, ніж 0,05 % мас., ще краще, менше, ніж 0,02 % мас. і найкраще менше, ніж 0,01 % мас. (за сухою речовиною). Ізолят білка або композиція білків можуть бути висушені будь-яким звичайним способом, наприклад, висушуванням розпилюванням, висушуванням у

25 псевдозрідженому шарі, ліофілізацією або висушуванням у вакуумному барабані, до сухої форми, щоб отримати сухий ізолят білка, який має вміст білка щонайменше 70 % мас., бажано щонайменше 80 % мас., більш бажано щонайменше 85 % мас. і навіть більш бажано щонайменше 90 % мас. Бажано сухий ізолят білка або композиція білків має вміст сухої речовини щонайменше 70 % мас., бажано щонайменше 80 % мас., більш бажано щонайменше

30 85 % мас. і навіть більш бажано щонайменше 90 % мас., ще краще щонайменше 91 % мас., навіть ще краще має вміст сухої речовини від 92 до 99 % мас. і, найкраще, від 93 до 98 % мас. У цілому, температуру ізоляту білків підтримують нижче 60°C під час висушування.

Відповідно до одного об'єкту винаходу ізолят білків, отриманий способом запропонованим даним винаходом, придатний для споживання людиною. Видалення фітатів, фенольних (або поліфенольних) сполук і глюкозинолатів запобігає появі неприємного запаху, смаку й кольору й знижує харчову цінність ізоляту білка. У той же час, це видалення підвищує вміст білка в ізоляті білка.

У даному процесі використовують рідини, які містять різні кількості водорозчинного розчинника, наприклад, етанолу. Фахівці зрозуміють, що деякі водорозчинні розчинники подібно

40 до потоків у способі можуть бути рециркульовані, можуть бути використані знову на інших етапах способу або можуть бути повторно використані після обробки, наприклад, після дистиляції, щоб підвищити вміст розчинника. Фахівці оцінять, що оптимальне використання водорозчинного розчинника, наприклад етанолу, може бути заплановане й як можна менше водорозчинного розчинника, наприклад етанолу, може бути "спожите" у способі, щоб одержати

45 екологічно безпечний спосіб.

Способи й матеріали

Вміст білків

Вміст білків визначали методом К'ельдаля згідно з офіційним методом AOAC 991.20 для визначення азоту (загального) у молоці. Щоб визначити кількість білка, застосовували

50 коефіцієнт перерахування 6,25 (% (мас./мас.)).

Вміст води

Вміст води визначали відповідно до: Food Chemical Codex, edition 7, General tests and assays, Appendix II, стор. 1133-1134

Загальний вміст зольних речовин

55 Загальний вміст зольних речовин визначали відповідно до: Food Chemical Codex edition 7, General tests and assays, Appendix II, C, стор. 1746.

Вміст фітатів

Вміст фітатів ґрунтується на визначенні фітази, описаному в Food Chemical Codex (FCC 7, General tests and assays, appendix V, стор. 1207 – 1208). Використовували реагенти й розчини

60 такі ж, за винятком ацетатного буфера, який додатково містить 1 % (об./об.) Tween 20. Замість

розчину субстрату використовували контрольний розчин фітату, який містить 10 мМоль фітату в ацетатному буфері. Розчин, що містить фітазу 1,25 од./мл в ацетатному буфері, був використаний для хімічного перетворення фітату. Калібровану шкалу фітату будували в інтервалі концентрацій від 0,1 до 0,5 мМоль фітату. Для всіх зразків і стандартів, інкубацію здійснювали при 37 °С протягом 120 хвилин. Вміст фітату в зразках виводили безпосередньо з відношення для стандарту фітату між концентрацією фітату й абсорбцією після реакції на 415 нм.

Розчинність азоту (РА%)

Розчини білків готували розчиненням білкового порошку при концентрації білка 2 % (мас./мас.) у демінералізованій воді. Доводили рН до 8,0 за допомогою 4М HCl або 4М NaOH. (Додатково сіль не додавали).

Розчини інкубували протягом 2 годин при 50 °С, енергійно збовтуючи. Після цього зразки центрифугували при 20,000 g протягом 5 хв. і збирали супернатант. Вміст білків супернатанта й зразків білкового порошку аналізували методом К'ельдаля. Розчинність азоту (РА%) визначали як:

$$РА\% = \frac{\text{Азот у супернатанті (мг)}}{\text{Загальний азот в 100 мг зразка}} \times 100 \%$$

Вміст поліфенолів або фенольних сполук

Концентрацію поліфенолів або фенольних сполук визначали, використовуючи метод СПРХ-УФ для кількісного визначення гірчиної кислоти і її аналогів. Метод заснований на аналізі фенольних сполук картоплі, описаному Narváez-Cuenca et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59 (10247-10255) з мінімальними модифікаціям, як описано нижче.

Система Acquity UPLC (Waters) оснащена колонкою Acquity UPLC BEH C18 (1.7 мкм, 2,1 × 150 мм, Waters), використовуючи детектор з діодною матрицею при 320 нм для детектування. Рухлива фаза А складалася з 0,1 % розчину мурашиної кислоти у воді, і рухлива фаза В складалася з 0,1 % розчину мурашиної кислоти в ацетонітрилі, застосовуючи швидкість потоку 0,4 мл/хв. у режимі градієнта. Температура колонки була встановлена на 30 °С, і об'єм впорскування становив 2 мкл.

Як контрольний стандарт (калібрувальна крива 0,1-100 мг/л) використовували гірчичну кислоту, розчинену в 50 об. % метанолу, що містить 0,5 % мас. оцтової кислоти. Приблизно 1,0 г зразка розчиняли в 10 мл 70 об. % метанолу й потім змішували протягом 1 год. Аліквоту переносили в пробірку Епендорфа, центрифугували протягом 10 хв. при 14,000 об./хв. і супернатант розбавляли в співвідношенні 1:1 50 об. % метанолом, який містять 0,5 % мас. оцтової кислоти.

Концентрацію поліфенолів розраховували визначенням загальної площі піків гірчиної кислоти і її аналогів шляхом інтерполяції калібрувальної кривої гірчиної кислоти. Сумарну концентрацію поліфенолів виражали в % мас.

Вміст вуглеводів

Сумарну концентрацію вуглеводів визначали аналізом фенол-сірчаної кислоти, який описаний Rao et al. Anal. Biochem. 181 (1989), pp. 18-22. Спосіб включає розкладання фракції полісахаридів шляхом кислотного гідролізу сірчаною кислотою (приблизно 70 %) до моносахаридів (тобто глюкози, манози) за підвищеної температури. У кислому середовищі моносахариди потім дегідрували й перетворювали на 2-фуральдегіди, так звані фурфурали. У кислому середовищі феноли протонізуються, породжуючи активні молекули, які будуть реагувати з молекулами фурфурала. Продукти конденсації є висококонденсованими й пігментують жовтогогарячого кольору може бути визначена спектрофотометрично при 490 нм.

Колір цієї сполуки відповідає кількості наявного моносахариду. Актуальний вміст обчислювали за калібрувальною кривою, отриманою при використанні глюкози як стандарту.

Вміст жирів

Вміст жирів визначали згідно з методом AOCS 6th edition, Ce 1-62

Вміст глюкозинолатів

Вміст глюкозинолатів визначали згідно COMMISSION REGULATION (EEC) No 1864/90 of 29 June 1990 amending Regulation (EEC) No 1470/68

Вміст етанолу (в продукті або композиції винаходу)

Вміст етанолу визначали з використанням ГХ у просторі під кришкою.

25 мг зразка й 1,5 г хлориду натрію поміщали в скляний флакон із кришкою. Зразок суспендували в 1 мл води, і флакон закривали. За температури 60 °С після того, як була

досягнута рівновага під кришкою, 1 мл повітря під кришкою впорскували в газохроматограф за допомогою роздрібного упорскування 1:20.

Газохроматограф був оснащений колонкою DB 624 (60 м × 0,25 мм в. д., плівка 1,2 мкм) і полум'яно-іонізаційним детектором. Газоподібний азот використовували як носій при швидкості потоку 3 мл/хв. Температуру колонки початково встановлювали на 50 °С, після чого з лінійним температурним градієнтом 30 °С/хв. підвищували до 200 °С, за цього значення витримували протягом 6 хв.

Етанол вимірювали полум'яно-іонізаційним детектором і для обробки даних використовували програмне забезпечення Chromeleon. Вміст етанолу в цій системі визначали упорскуванням стандартного етанолу. Кількість етанолу в зразку визначали використовуючи додавання стандарту етанолу до зразка в придатному інтервалі.

Визначення вмісту білків S-фракцій, наприклад, вмісту білків 2S і 12S у білках насіння рапсу

Вміст S-фракцій визначали, використовуючи гель-проникаючу хроматографію, з комерційно очищеними білками насіння рапсу як контрольним зразком. Зразки білка розчиняли в елюенті, 0,1 М розчині NaCl. Розділення здійснювали на колонці Waters BEH200 (1,7 мкм, 4,6 × 150 мм), при 40 °С і 0,5 мл/хв. Детектування білкових піків здійснювали, використовуючи Уф-абсорбцію при 280 нм і показник переломлення. Кількісне визначення вмісту S фракцій здійснювали, ґрунтуючись на області основних піків у хроматограмі контрольних білків.

Приклад 1

1 кг двічі відпресованої макухи насіння рапсу суспендували в 5 літрах води. Під час змішування рН доводили до 7, використовуючи розчин гідроксида натрію. Екстракцію проводили за контрольованої температури 30°C протягом 1 години при перемішуванні. Розділення твердої й рідкої фаз здійснювали протягом 30 хвилин при приблизно 4000 g за кімнатної температури (22°C). Супернатант збирали декантацією й пропусканням крізь сито (сито 0,15-0,25 мм), щоб вилучити верхній шар жиру.

Концентрування водного екстракту здійснювали, використовуючи модуль ультрафільтрації 10 кДа (УФ) і насос. Концентрат був приблизно десять раз концентрований, враховуючи супернатант до концентрування. Концентрат промивали 3 рази водою (об'ємне співвідношення концентрат: вода = 1:3) і відмитий концентрат збирали з модуля УФ. Мембрану промивали деякою кількістю води, щоб підвищити вихід білка й коефіцієнт кінцевого концентрування склав приблизно 4 рази.

Індувану етанолом преципітацію здійснювали додаванням харчового концентрованого етанолу (95 %) до промитого концентрату до кінцевої концентрації 70 об. % етанолу (об'ємне співвідношення концентрат: етанол = 1:2,3). Під час додавання етанолу суміш ретельно перемішували. Преципітат видаляли після центрифугування (15 хв. 4000 g за кімнатної температури) і повторно суспендували в 70 об. % етанолу (масове співвідношення 1:5). Після центрифугування (15 хв. 4000 g за кімнатної температури) гранули сушили у вакуумному інкубаторі (120 мбар, 45°C), щоб одержати в результаті 210 г білка насіння рапсу, що має вміст сухої речовини 93,6 %.

Приклад 2. Лабораторний дослід, екстракція при 30 °С

Був проведений лабораторний експеримент, який включає преципітацію етанолом (індувану етанолом преципітацію = ІЕП) з макухою насіння рапсу, екстрагованого при 30 °С.

1500 г макухи насіння рапсу суспендували в 7500 г технічної води. Доводили рН до 7 додаванням 70 г 4 N NaOH. Екстракцію здійснювали протягом 90 хвилин при 30 °С при помірному перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій посудині. Початкова температура суспензії насіння рапсу була доведена до 30 °С шляхом використання підігрітої води перед додаванням макухи насіння рапсу.

Розділення жиру, твердої й рідкої фази здійснювали, використовуючи центрифугу з горизонтальним ротором (4000 g, 30 хвилин, 10 °С). Верхній жировий шар відокремлювали від водної фази пропусканням екстракту крізь сито (0,25 мм).

Водну фракцію концентрували й промивали за кімнатної температури, використовуючи насос і мембрану 10 кДа. Застосований трансмембранний тиск становив 1 бар. Промивання здійснювали після концентрування водної фракції від 6342 г до 400 г 3 × 3 об'ємами деіонізованої води. Підсумковий промитий концентрат (1018 г) мав вміст сухої речовини 23 %.

970 г концентрату суспендували з 2266 мл 96 об. % етанолу за температури 10 °С. Після повного змішування, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку із звивистими лопатями, суміш центрифугували в центрифугі з горизонтальним ротором (4000 g, 10 хвилин, 10 °С). Осад повторно суспендували в 1440 мл 70 об. % етанолу за температури 10 °С і, після повного змішування, центрифугували знову. Осад після розминання ложкою висушували. Висушений матеріал потім гомогенізували й подрібнювали, використовуючи міксер IKA M20.

Таблиця 2

Склад фракцій при лабораторній переробці насіння рапсу при 30 °С

Зразок	Суша речовина (%)	Білок (% за СР)	Жир (% за СР)	Фенольні сполуки (% за СР)	Фенольні сполуки Вихід (%)
Макуха насіння рапсу	90	38	19	1,5	100
Водний екстракт	7,7	53	5,6	2,2	53
Промитий концентрат до ІЕП	22	87	9,5	0,24	2,7
Промитий концентрат після ІЕП і висушування	93	86	6,4	0,01	0,02

Приклад 3. Лабораторний дослід, екстракція при 15 °С

Був проведений лабораторний експеримент, який включає преципітацію етанолом, з макухою насіння рапсу, екстрагованим при 15 °С.

800 г макухи насіння рапсу суспендували в 4000 г технічної води. Доводили рН до 7 додаванням 35 г 4 Н NaOH. Екстракцію здійснювали протягом 30 хвилин при 15 °С при помірному перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій посудині з кожухом, приєднаним до водяної бані. Початкову температуру суспензії насіння рапсу встановлювали на рівні 15 °С шляхом використання холодної води перед додаванням макухи насіння рапсу.

Розділення жиру, твердої й рідкої фази здійснювали, використовуючи центрифугу з горизонтальним ротором (4000 g, 30 хвилин, 10 °С). Верхній жировий шар відокремлювали від водної фази пропусканням екстракту крізь сито (0,25 мм).

Водну фракцію концентрували й промивали при 15 °С, використовуючи насос і мембрану 10 кДа. Застосований трансмембранний тиск становив 1 бар. Промивання здійснювали після концентрування водної фракції від 3193 г до 519 г (вміст сухої речовини 19 %) 3 × 3 об'ємами деіонізованої води.

496 г концентрату суспендували з 1165 мл 96 об. % етанолу за температури 10 °С. Після повного змішування, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку із звивистими лопатями, суміш центрифугували в центрифугі з горизонтальним ротором (4000 g, 10 хвилин, 10 °С). Осад повторно суспендували в 1000 мл 70 об. % етанолу за температури 10 °С і, після повного змішування, центрифугували знову. Осад після розминання ложкою сушили. Висушений матеріал потім гомогенізували й подрібнювали, використовуючи міксер IKA M20.

Таблиця 3

Склад фракцій при лабораторній переробці насіння рапсу, екстрагованих при 15 °С

Зразок	Суша речовина (%)	Білок (% за СР)	Жир (% за СР)	Фенольні сполуки (% за СР)	Фенольні сполуки Вихід (%)
Макуха насіння рапсу	92	38	17	1,8	100
Водний екстракт	6,4	50	5,2	2,8	43
Промитий концентрат до ІЕП	19	79	7,3	0,91	6,6
Промитий концентрат після ІЕП і висушування	90	87	6,3	0,06	0,04

Розчинність азоту промитого концентрату після ІЕП і висушування склала 74 %

Приклад 4. Лабораторний дослід, екстракція при 50 °С

Більший лабораторний експеримент, який включає преципітацію етанолом, з макухою насіння рапсу, екстрагованого при 50 °С, був здійснений у трьох експериментах.

В 3 окремих експериментах усього 4800 г макухи насіння рапсу суспендували в 24000 г технічної води. Доводили рН до 7 додаванням 212 г 4 Н NaOH. Екстракцію здійснювали протягом 30 хвилин при 50 °С при помірному перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій посудині. Початкову температуру суспензії насіння рапсу встановлювали 50 °С шляхом використання води при 60 °С перед додаванням макухи насіння рапсу.

Після інкубації температуру суспензії насіння рапсу знижували до 15 °С заміною води у водяній бані на крижану холодну воду. Період охолодження тривав приблизно 30 хвилин.

Розділення жиру, твердої й рідкої фази здійснювали, використовуючи центрифугу з горизонтальним ротором (4000 g, 30 хвилин, 10 °С). Верхній жировий шар відокремлювали від водної фази пропусканням екстракту крізь сито (0,25 мм).

Водну фракцію (3 партії) концентрували й промивали при 50 °С, використовуючи насос і мембрану 10 кДа. Застосований трансмембранний тиск становив 2,5 бар. Промивання здійснювали після концентрування водної фракції від 6000 г до 600 г 3 × 3 об'ємами деіонізованої води.

1000 г промитого концентрату суспендували з 2300 мл 96 об. % етанолу за температури 10 °С. Після повного змішування, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку із звивистими лопатями, суміш центрифугували в центрифугі з горизонтальним ротором (4000 g, 10 хвилин, 10 °С). Осад повторно суспендували в 2000 мл 70 об. % етанолу за температури 10 °С і, після повного змішування, центрифугували знову. Осад після розминання ложкою висушували. Висушений матеріал потім гомогенізували й подрібнювали, використовуючи міксер ІКА М20.

Таблиця 4

Склад фракцій при лабораторній переробці насіння рапсу, екстрагованих при 50 °С

Зразок	Суша речовина (%)	Білок (% за СР)	Жир (% за СР)	Фенольні сполуки (% за СР)	Фенольні сполуки Вихід (%)
Макуха насіння рапсу	92	38	19	1,8	100
Водний екстракт					
Експеримент 1	7,2	52	6,1	2,6	43
Експеримент 2	7,3	50	6,5	2,5	42
Експеримент 3	7,4	51	7,1	2,3	39
Промитий концентрат					
Експеримент 1	20	86	10	Не виявлені	Не виявлені
Експеримент 2	19	85	11	0,16	1,2
Експеримент 3	25	88	9,8	0,12	0,9
Промитий концентрат після ІЕП і висушування					
Експеримент 1	93	87	9,7	< 0,01	<0,1
Експеримент 2	96	89	9,5	< 0,01	<0,1
Експеримент 3	95	88	8,5	0,01	0,1

Розчинність азоту промитого концентрату після ІЕП і висушування (суміш експериментів 1, 2 і 3) склала 74 %.

Приклад 5. Напівпромислові умови, екстракція при 50 °С

Макуху насіння рапсу екстрагували при 50 °С за напівпромислових умов. Подальшу переробку промитого концентрату здійснювали в лабораторних умовах.

60 кг макухи насіння рапсу суспендували в 300 кг води. Доводили рН до 6 додаванням 2,625 кг 1 Н NaOH. Екстракцію здійснювали при 50 °С при перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й невелику мішалку з вигнутими лопатями в 500-літровій судині. Воду кип'ятили й охолоджували до 60 °С перед додаванням макухи насіння рапсу. Інкубація тривала протягом 2 годин внаслідок обмеженої продуктивності використаного декантатора (300 кг/год.).

Після декантатора температуру екстракту знижували до 15 °С через теплообмінник. Розділення жиру й рідкої фази здійснювали, використовуючи тарілчастий сепаратор безперервної дії. Об'єм жирової бічної фракції становив 10 % загального об'єму.

Водну фракцію концентрували й промивали при 50 °С, використовуючи ультрафільтраційне обладнання з керамічною мембраною 10 кДа. Застосований трансмембранний тиск становив 2,5 бар. Промивання після концентрування здійснювали безперервно 4 об'ємами деіонізованої води.

До 10 кг промитого концентрату (вміст сухої речовини 16 %) при слабому перемішуванні додавали 23 л етанолу (96 об. %, 10 °С). Суміш при 70 об. % етанолу центрифугували в центрифугі з горизонтальним ротором (4000 g, 10 хвилин, 10 °С). Осад повторно суспендували в 4 л 70 об. % етанолу за температури 10 °С і, після повного змішування, центрифугували

знову. Осад після розминання ложкою сушили. Висушений матеріал (1230 г 97 % сухої речовини) потім гомогенізували й подрібнювали, використовуючи альпійський млин (пластина 1 мм меш).

Таблиця 5

Склад фракцій при напівпромисловій переробці насіння рапсу, екстрагованих при 50 °C

Зразок	Суша речовина (%)	Білок (% за СР)	Жир (% за СР)	Фенольні сполуки (% за СР)	Фенольні сполуки Вихід (%)	Фітат (% за СР)
Макуха насіння рапсу	92	38	17	1,7	100	2,5
Водний екстракт після декантації	8	48	12	2,6	39	не виявлений
Промитий концентрат	16	74	19	0,29	1,4	не виявлений
Промитий концентрат після ІЕП і висушування	97	72	14	0,05	0,18	0,14

5

Розчинність азоту промитого концентрату після ІЕП і висушування склала 81 %.

Приклад 6. Етанольна преципітація макухи соняшника

Щоб показати дію етанольної преципітації на олієвмісному насінні, відмінному від рапсового, процес проводили на макусі соняшника (після 1-разового пресування).

10

1600 г розмеленої макухи соняшника суспендували в 8000 г технічної води. Ендогенний рН дорівнював 7, так що регулювання не застосовували. Додавали сульфід (1 г/л), щоб контролювати мікробіологію й запобігти окисненню фенольних сполук. Екстракцію здійснювали протягом 30 хвилин при 15 °C при помітному перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій посудині.

15

Розділення жиру, твердої й рідкої фази здійснювали, використовуючи центрифугу з горизонтальним ротором (4000 g, 30 хвилин, 10 °C). Верхній жировий шар відокремлювали від водної фази пропусканням екстракту крізь сито (0,25 мм).

Водну фракцію концентрували й промивали при 15 °C, використовуючи ультрафільтраційне обладнання й мембрану 10 кДа. Застосований трансмембранний тиск становив 2,5 бар. Промивання здійснювали після концентрування водної фракції 3 × 3 об'ємами деіонізованої води.

20

До 200 г промитого концентрату (вміст сухої речовини 10,0 %), повільно, при перемішуванні додавали 460 мл етанолу (96 об. %, 10 °C). Суміш при 70 об. % етанолу центрифугували в центрифугі з горизонтальним ротором (4000 g, 10 хвилин, 10 °C). Осад повторно суспендували в 200 мл 70 об. % етанолу за температури 10 °C і, після повного змішування, центрифугували знову. Осад після розминання ложкою висушували.

25

Таблиця 6

Склад фракцій при лабораторній переробці при 15 °C макухи соняшника

Зразок	Суша речовина (%)	Білок (% за СР)	Жир (% за СР)	Фенольні сполуки (% за СР)	Фенольні сполуки Вихід (%)
Макуха соняшника	93,2	30	32	1,1	100
Водний екстракт	3,5	41	5,6	3,3	42
Промитий концентрат	10,0	85	7,5	0,26	1,3
Промитий концентрат після ІЕП і висушування	71,5	89	5,7	0,01	0,04

Приклад 7. Етанольна преципітація соєвого борошна

30

Здійснювали комбінацію холодної й етанольної преципітації не знежиреного ферментативно активного соєвого борошна.

1600 г розмеленої макухи соняшника суспендували в 8000 г технічної води. Ендогенний рН

дорівнював 6,8 так що регулювання не застосовували. Додавали сульфід (1 г/л), щоб контролювати мікробіологію й запобігти окисленню фенольних сполук. Екстракцію здійснювали протягом 30 хвилин при 15 °С при помітному перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій судині.

5 Розділення жиру, твердої й рідкої фази здійснювали, використовуючи центрифугу з горизонтальним ротором (4000 g, 30 хвилин, 10 °С). Верхній жировий шар відокремлювали від водної фази пропусканням екстракту крізь сито (0,25 мм).

Водну фракцію концентрували й промивали при 15 °С, використовуючи насос і мембрану 10 кДа в термостатованій посудині. Застосований трансмембранний тиск становив 2,5 бар. 10 Промивання здійснювали після концентрування водної фракції 3 × 3 об'ємами попередньо нагрітої деіонізованої води.

До супернатанту (765 г) повільно, при перемішуванні додавали 1780 мл (1419 г) етанолу (96 об. %) за температури 10 °С. Суміш при 70 об. % етанолу центрифугували в центрифугі з горизонтальним ротором (4000 g, 10 хвилин, <10 °С). Осад повторно суспендували в 1500 мл 70 об. % етанолу за температури 10 °С і, після повного змішування, центрифугували знову. Осад 15 після розминання ложкою висушували. Висушений матеріал (189 г с 83 % сухої речовини) далі гомогенізували, використовуючи міксер IKA M20.

Таблиця 7

Склад фракцій при лабораторній переробці при 15 °С незнежиреної ферментативно активного соєвого борошна

Зразок	Суша речовина (%)	Білок (% за СР)	Жир (% за СР)	Фенольні сполуки (% за СР)	Фенольні сполуки Вихід (%)
Соєве борошно	94	42	24	0,08	100
Водний екстракт	10	53	14	0,11	71
Промитий концентрат до ІЕП	26	65	16	0,05	20
Промитий концентрат після ІЕП і висушування	83	74	14	< 0,01	0,3

20 Приклад 8. Попередня обробка макухи насіння рапсу ізогексаном або етанолом

Щоб показати вплив попередньої обробки макухи насіння рапсу після пресування на видалення фенольних сполук, був проведений експеримент, який порівнює водну екстракцію макухи насіння рапсу ізогексаном або 70 об. % етанолом і без попередньої обробки. Результати виявили несподіваний ефект етанолу на видалення фенольних сполук у порівнянні з водою й 25 неводними розчинниками, що змішуються з нею.

Попередня обробка ізогексаном

1000 г макухи насіння рапсу екстрагували, використовуючи 5 л ізогексану. Після 1 години інкубації за кімнатної температури, розділення твердої й рідкої фаз здійснювали фільтрацією. Маса гранул після висушування склала 831,5 г, суха речовина склала 92,5 %. 30

Макуху насіння рапсу після попередньої обробки ізогексаном суспендували в 4332 г технічної води. Доводили рН до 7 рН додаванням 62,72 г 4 Н NaOH. Екстракцію здійснювали при 30 °С при перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й малу мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій посудині.

Попередня обробка етанолом

35 1000 г макухи насіння рапсу екстрагували, використовуючи 5 л 70 об. % етанолу. Після 1 години інкубації при 30 °С, розділення твердої й рідкої фаз здійснювали центрифугуванням (4000 g, 30 хвилин, 20 °С). Маса гранул після висушування склала 844,2 г, суха речовина склала 86,0 %.

Після попередньої обробки етанолом макуху насіння рапсу суспендували в 4309 г технічної 40 води. Доводили рН до 7 рН додаванням 30,73 г 4 Н NaOH. Екстракцію здійснювали при 30 °С при перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й малу мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій судині.

Макуха насіння рапсу без попередньої обробки:

45 1000 г макухи насіння рапсу суспендували в 5000 г технічної води. Доводили рН до 7 додаванням 40,66 г 4 Н NaOH. Екстракцію здійснювали протягом 60 хвилин при 30 °С при помітному перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій посудині.

Для всіх 3 суспензій розділення жиру, сухих речовин і рідкої фази здійснювали, використовуючи центрифугу з горизонтальним ротором (4000 g, 30 хвилин, 10 °C). Верхній жировий шар відокремлювали від водної фази пропусканням екстракту крізь сито (0,25 мм).

- 5 Водну фракцію концентрували й промивали за кімнатної температури, використовуючи насос і мембрану 10 кДа в 2-літровій посудині. Застосований трансмембранний тиск становив 1 бар. Промивання здійснювали після концентрування водної фракції від 4000 г до 600 г 3 × 3 об'ємами деіонізованої води.

Таблиця 8

Склад фракцій при лабораторній переробці макухи насіння рапсу після попередньої обробки при 30 °C

Зразок	Суха речовина (%)	Білок (% за СР)	Жир (% за СР)	Фенольні сполуки (% за СР)	Фенольні сполуки Вихід (%)
Макуха насіння рапсу, неопрацьована	91	37	19	1,5	100
Водний екстракт	7,7	54	5,5	2,0	46
Промитий концентрат	20	85	9,8	0,18	3,8
Макуха насіння рапсу, екстрагована ізогексаном	93	45	4,9	1,8	96
Водний екстракт	8,2	54	2,5	2,0	42,3
Промитий концентрат	18	92	4,7	0,20	1,8
Макуха насіння рапсу, екстрагована етанолом	86	40	20	0,22	21
Водний екстракт	4,6	69	2,5	0,55	6,0
Промитий концентрат	13	93	3,8	0,02	0,1

- 10 Приклад 9. Лабораторний дослід, екстракція при 30 °C

1500 г макухи насіння рапсу суспендували в 7500 г технічної води. Доводили рН до 7 додаванням 59 г 4 N NaOH. Екстракцію здійснювали протягом 60 хвилин при 30 °C при помірному перемішуванні, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку з вигнутими лопатями в 10-літровій посудині. Початкову температуру суспензії насіння рапсу встановлювали

- 15 30 °C шляхом використання попередньо нагрітої води перед додаванням макухи насіння рапсу. Розділення жиру, твердої й рідкої фази здійснювали, використовуючи центрифугу з горизонтальним ротором (4000 g, 30 хвилин, 10 °C). Верхній жировий шар відокремлювали від водної фази пропусканням екстракту крізь сито (0,25 мм).

- 20 Водну фракцію концентрували й промивали за кімнатної температури, використовуючи насос і мембрану 10 кДа. Застосований трансмембранний тиск становив 1 бар. Промивання здійснювали після концентрування водної фракції від 6000 г до 650 г 3 × 2,5 об'ємами деіонізованої води. Кінцевий відмитий концентрат (928 г) мав вміст сухої речовини 21 %.

- 25 842 г концентрату суспендували з 2062 г 96 об. % етанолу за температури 10 °C. Після повного змішування, використовуючи мішалку з верхнім приводом й мішалку із звивистими лопатями, суміш центрифугували в центрифугі з горизонтальним ротором (4000 g, 10 хвилин, 10 °C). Осад повторно суспендували в 1000 мл 70 об. % етанолу за температури 10 °C і, після повного змішування, центрифугували знову. Осад після розминання ложкою висушували. Висушений матеріал потім гомогенізували й подрібнювали, використовуючи міксер IKA M20.

- 30 Вміст етанолу у відмитому концентраті після ІЕП і висушування складав 0,15 % мас.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб виділення нативного білка з борошна насіння олійної культури або макухи насіння олійної культури, який передбачає наступні етапи:

- 35 - екстрагування борошна насіння олійної культури водою, щоб одержати водний розчин;
- концентрування водного екстракту до концентрованого водного розчину, який містить від 5 до 30 % мас. білка;
- додавання водорозчинного розчинника до концентрованого водного розчину, щоб одержати преципітат білка; при цьому водорозчинним розчинником є етанол, який додається в кінцевій
40 концентрації від 60 до 80 об. %; і

- відділення преципітату білка від водної фракції.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що включає додатковий етап промивання преципітату білка.
3. Спосіб за п. 1 або п. 2, який **відрізняється** тим, що включає додатковий етап висушування преципітату білка.
4. Спосіб за кожним з попередніх пунктів, який **відрізняється** тим, що після етапу екстракції й до додавання водорозчинного розчинника водний розчин або концентрований водний розчин піддають діафільтрації.
5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що діафільтрацію здійснюють за допомогою UF (ультрафільтрації).
6. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що розчинні вуглеводи, глюкозинолати або їх похідні, фітати або поліфенольні сполуки або комбінацію однієї або більше з цих сполук видаляють із водного розчину або концентрованого водного розчину.
7. Спосіб за п. 4 або п. 5, який **відрізняється** тим, що діафільтрація має місце до, під час або після концентрування водного екстракту.
8. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що борошно насіння олійної культури є борошном з насіння рапсу, сої або соняшнику.
9. Виділений нативний білок насіння олійної культури або композиція нативного білка насіння олійної культури, яка має:
- вміст білка щонайменше 80 % мас. (за сухою речовиною);
 - вміст етанолу менше ніж 0,2 % мас. (за сухою речовиною);
 - вміст етанолу більше ніж 0,001 % мас. (за сухою речовиною); і
 - вміст фенольних сполук менше ніж 0,1 % мас. (за сухою речовиною), виражений в еквівалентах гірчичної кислоти.
10. Виділений нативний білок насіння олійної культури або композиція нативних білків насіння олійної культури за п. 9, який **відрізняється** тим, що має вміст глюкозинолатів менше ніж 10 мкмоль/г (за сухою речовиною).
11. Виділений нативний білок насіння олійної культури або композиція нативних білків насіння олійної культури за п. 9 або п. 10, який **відрізняється** тим, що має вміст ліпідів від 2 до 15 % мас. (за сухою речовиною).
12. Виділений нативний білок, який **відрізняється** тим, що насіння олійної рослини або композиція нативних білків насіння олійної рослини за п. 9 або п. 10 має вміст ліпідів 2-20 % мас. (за сухою речовиною) у випадку соєвого білка.
13. Виділений білок або композиція білків за кожним з пунктів 9-12, який **відрізняється** тим, що має вміст фітату ($P \times 3,5$) менше ніж 0,5 % мас. (за сухою речовиною).
14. Виділений білок або композиція білків за кожним з пунктів 9-13, який **відрізняється** тим, що має розчинність щонайменше 30 NS %.
15. Виділений білок або композиція білків за кожним з пунктів 9-14, який **відрізняється** тим, що має вміст сухої речовини щонайменше 70 % мас.
16. Виділений білок або композиція білків за будь-яким з пп. 9-14, який **відрізняється** тим, що має вміст сухої речовини 92-99 % мас.
17. Виділений білок або композиція білків за кожним з пп. 9-16, який **відрізняється** тим, що містить білки насіння рапсу, сої або соняшнику.
18. Виділений білок або композиція білків за кожним з пп. 9-16, який **відрізняється** тим, що містить насіння рапсу й внаслідок чого білки 2S і білки 12S будуть присутні в співвідношенні 1:6 до 6:1 (мас./мас. за сухою речовиною).
19. Виділений білок або композиція білків за будь-яким з пп. 9-16, який **відрізняється** тим, що містить насіння рапсу і на підставі чого білки 2s і білки 12s будуть присутніми в співвідношенні від 1:2 до 2:1 (мас./мас. за сухою речовиною).

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601