

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091366** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.09.03

(51) Int. Cl. *A23J 1/00* (2006.01)
A23G 1/30 (2006.01)
A23K 50/40 (2016.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.12.04

(54) **ОБЕСЦВЕЧЕННЫЙ ИЗОЛЯТ РАПСОВОГО БЕЛКА**

(31) 17205438.9

(32) 2017.12.05

(33) EP

(86) PCT/EP2018/083424

(87) WO 2019/110555 2019.06.13

(71) Заявитель:
ДСМ АйПи АССЕТС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Хилькема Нинке Нина, Смолдерс
Герардус Йоханнес Франсискус (NL)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение раскрывает растворимый изолят нативного рапсового белка, имеющий улучшенный цвет, способ получения растворимого изолята нативного рапсового белка, имеющего улучшенный цвет, и использование указанного изолята рапсового белка в пищевом продукте.

A1

202091366

202091366

A1

ОБЕСЦВЕЧЕННЫЙ ИЗОЛЯТ РАПСОВОГО БЕЛКА

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к растворимому изоляту нативного рапсового белка, имеющему улучшенный цвет, к способу приготовления растворимого изолята нативного рапсового белка, имеющего улучшенный цвет, и к применению указанного изолята рапсового белка в пищевом продукте.

Предшествующий уровень техники

Белок является главным фактором питания человека. Он может быть получен от животных (например, из мяса, рыбы, яиц, молочных продуктов) или овощей. Существует общая потребность в уменьшении количества белка животного происхождения. Использование яичного белка часто нежелательно.

Использование растительного белка в питании человека известно, например, из WO 2008/094434, где раскрыто использование изолятов пшеничного белка в качестве альтернативы использованию белка яичного желтка. Однако использование изолятов пшеничного белка может быть нежелательным для людей с непереносимостью глютена. Использование соевого белка вместо сывороточного белка также было описано, например, в WO 2014/018922. Соевый белок широко используется, но ввиду некоторой непереносимости соевых продуктов существует потребность в других источниках растительных белков.

Подходящие альтернативы включают гороховый белок и рапсовый белок. Рапс богат маслом и содержит значительное количество белка, что составляет от 17 до 25% от массы сухого вещества семян. Переработка рапса на масло для потребления человеком дает рапсовую муку (60%) в качестве побочного продукта, который содержит от 30 до 40% белка. Рапс, используемый для этой цели, обычно относится к сортам *Brassica napus* и *Brassica juncea*. Эти сорта содержат низкий уровень эруковой кислоты и глюкозинолата, и известны как канола. Канола является сокращением от слов «Канада» и «-ola», от «oil low acid», т.е. «масло с низким содержанием кислоты», но в настоящее время это общий термин, определяемый как рапсовое масло, содержащее <2% эруковой кислоты и <30 ммоль/г глюкозинолата. Полученную в результате рапсовую муку в настоящее время используют в качестве корма для животных с высоким содержанием белка.

Белки доступны в виде гидролизатов, концентратов и изолятов. Гидролизаты - это белки, которые были частично разрушены за счет воздействия нагревания, кислоты или ферментов, которые разрывают связи между аминокислотами. Это делает белок более

горьким на вкус, но также позволяет ему быстрее усваиваться во время пищеварения, чем нативный (негидролизированный) белок. Изоляты являются более чистыми, чем концентраты, что означает, что другие небелковые компоненты были частично удалены, чтобы «изолировать» белок. Многие концентраты содержат около 80% белка, что означает, что в сухом виде 80% от общей массы составляет белок. Изоляты обычно содержат около 90% белка (в пересчете на сухое вещество). Это рассчитывают с использованием метода Кьельдаля.

Преобладающими запасными белками, содержащимися в рапсе, являются круциферины и напины. Круциферины представляют собой глобулины и являются основным запасным белком в семени. Круциферины состоят из 6 субъединиц и имеют общую молекулярную массу приблизительно 300 кДа. Напины являются альбуминами и представляют собой запасные белки с низкой молекулярной массой приблизительно 14 кДа. Напины легче растворяются, и например, в EP 1715752B1 раскрыт способ выделения более растворимой фракции напинов, предпочтительно по меньшей мере до 85 масс.%. Напины прежде всего предложены для применения в приложениях, где растворимость является ключевой. В DE 10 2014 005466 A1 также описан способ получения очищенных фракций круциферинов и напинов. Посредством способа также получают смесь белков из двух компонентов с 55-60% напинов и 40-45% круциферинов. Растворимость этой белковой смеси составляет приблизительно 75%.

Белки рапса также можно разделить на различные фракции в зависимости от соответствующих коэффициентов седиментации в единицах Сведберга (S). Этот коэффициент указывает на скорость оседания макромолекулы в центробежном поле. Для белков рапса основными фракциями, о которых сообщают, являются 12S, 7S и 2S. Круциферин и напин - это два основных семейства запасных белков, которые содержатся в каноле/рапсе. Напин представляет собой альбумин 2S, а круциферин представляет собой глобулин 12S. Кроме того, Schwenke и Linow (Nahrung (1982) 26, K5-K6) утверждают, что обратимая диссоциация глобулина 12S из рапса (*Brassica napus L.*) зависит от ионной силы. Комплекс круциферина присутствует в виде гексамера 12S с молекулярной массой 300 кДа при воздействии более высокой ионной силы ($\mu \geq 0,5$ мС/см) и обратимо диссоциирует на тримерные молекулы 7S с молекулярной массой 150 кДа при воздействии условий низкой ионной силы.

Получение изолятов рапсового белка из рапсовой муки описано, например, в EP 1389921B1, где раскрыта экстракция муки из масличных семян рапса водным раствором соли пищевого качества для получения водного белкового раствора, с последующим выделением двух фракций белка через мицеллы. В WO 2013/000066 раскрыты белковые

продукты рапса, имеющие содержание белка по меньшей мере около 60 масс.% с низким содержанием фитиновой кислоты, с преимущественным содержанием равных частей 2S и 7S с небольшим содержанием 12S. EP 1720415 раскрывает способ получения изолята рапсового белка, содержащего от 25 до 55 масс.% белка 2S рапса, от 47 до 75 масс.% белка 7S рапса и от 0 до 15 масс.% белка 12S рапса. Этот способ требует использования большого количества соли, что не является проблемой в аквакультуре, но не подходит для питания человека. В WO 2016/042001 описан способ, в котором не требуется выделять белковые компоненты, и все же можно поддерживать растворимость в более широком диапазоне pH.

Было обнаружено, что изолят рапсового белка высокой чистоты обладает широкими функциональными возможностями в пищевых продуктах, уникальных среди белковых материалов. Возможность использовать в пищевых продуктах белок растительного происхождения позволяет получать действительно вегетарианские продукты питания в тех случаях, когда яичный белок и/или белок животного происхождения использовали при отсутствии какого-либо доступного заменителя.

Проблема, связанная с изолятами рапсового белка, полученными описанными выше процедурами, заключается в том, что они имеют относительно темный, желтый или коричневатый цвет и часто нежелательный вкус. Например, окраска часто делает пищевой продукт визуально непривлекательным, что делает потребление белка растительного происхождения в питании человека излишне проблематичным.

Описание чертежей

На Фигуре 1 изображена цветность раствора, полученного после обработки экстрактов рапсового белка различными концентрациями L-аскорбиновой кислоты или L-цистеина в разные промежутки времени. Ось X: время инкубации в часах. Ось Y: значение 100-L. Объяснение символов: ○ = контроль; ● = L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг); ■ = L-аскорбиновая кислота (1,0 г/кг); ▲ = L-цистеин (0,5 г/кг); ◆ = L-цистеин (1,0 г/кг).

Фигура 2 изображает цветность раствора, полученного после инкубации при 56°C экстрактов рапсового белка, приготовленных с различными концентрациями L-аскорбиновой кислоты и/или метабисульфита натрия в экстракционной жидкости через различные промежутки времени. Ось X: время инкубации в часах. Ось Y: значение 100-L. Обратите внимание, что после измерений при $t = 3$ ч эксперименты были временно прекращены путем хранения образцов в течение более длительного времени (10 недель) при -20°C. После этого измерения продолжали, проводя инкубацию при 56°C в моменты времени, указанные на фигуре, то есть промежутков времени, в течение которого образцы были заморожены, на графике не указывается. Объяснение символов: ○ = контроль; ◆ = L-

аскорбиновая кислота (0,5 г/кг); □ = метабисульфит натрия (0,1 г/кг); ● = L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,05 г/кг); ■ = L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,1 г/кг); ▲ = L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,05 г/кг); ◆ = L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,1 г/кг).

Подробное описание изобретения

Сообщается, что проблема окрашивания изолятов рапсового белка связана с фенольными соединениями. Рапс содержит примерно в десять раз больше фенольных соединений, чем найдено в соевых бобах. При окислении фенольные соединения могут вызвать развитие темного цвета. В WO 2004/000032 эту проблему решают путем применения многогранного подхода. Способ включает обработку рапса (в частности, инактивацию мирозиназы в лущеных семенах), обработку муки (особенно использование растворителей для извлечения фенольных и других красящих компонентов), использование определенной формы муки (особенно муки, из которой растворитель удален воздухом, или жареной муки), использование особых условий экстракции (в частности, путем добавления антиоксиданта или агента, абсорбирующего красящий компонент), обработку экстракта (в частности, диафильтрацию в присутствии антиоксиданта) и извлечение изолята (особенно путем экстракции изолята растворителем или путем добавления концентрированного раствора в охлажденную воду). Среди широкого спектра возможных мер в WO 2004/000032 описано применение антиоксидантов, таких как сульфит натрия или аскорбиновая кислота, для предотвращения окисления фенольных соединений. Эффект измеряют по уменьшенной оптической плотности при 420 нм (A420, окисленные фенольные соединения) и поддерживаемой оптической плотности при 330 нм (A330, не-окисленные фенольные соединения). Действительно, присутствие аскорбиновой кислоты снижает значения A420 и поддерживает значения A330. Тем не менее, значения A330 и A420 дают информацию только о наличии или отсутствии фенольных соединений и продуктов фенольного окисления желтого цвета, и не дают информации об общей белизне продукта, которую обычно выражают путем измерения значений L. Однако для некоторых экспериментов WO 2004/000032 приводит значения L. Так, значения L между 80,67 и 83,53 отмечены после экстракции окраски этанолом, значение L около 81 отмечено при комбинации адсорбента с аскорбиновой кислотой, и самое высокое значение L (84,32) наблюдалось в осажденном изоляте рапсового белка, где проводили как экстракцию этанолом, так и обработку аскорбиновой кислотой. Наконец, в отдельных экспериментах сульфит натрия демонстрирует улучшенные значения A330, хотя в комбинации с дополнительной мерой,

такой как диафильтрация. Принимая во внимание результаты предшествующего уровня техники, существует значительная возможность для улучшения белизны изолятов рапсового белка, то есть для более высоких значений L (или более низких значений 100-L, альтернативного представления, которое иногда используют по практическим соображениям).

В первом аспекте изобретения предложен способ получения изолята нативного рапсового белка, включающий стадии:

(i) смешивание муки от холодного отжима рапсового масла с водной жидкостью при температуре от 45 до 65°C;

(ii) отделение водной жидкости от смеси, полученной на стадии (i);

(iii) обезжиривание водной жидкости, полученной на стадии (ii);

(iv) доведение pH обезжиренной водной жидкости, полученной на стадии (iii), до нейтрального значения путем добавления кислоты или основания, и смешивание с осадителем для получения осадка, где указанный осадитель включает соль магния, цинка, железа или кальция;

(v) удаление осадка, полученного на стадии (iv), для получения водной жидкости;

(vi) концентрирование и промывание водной жидкости, полученной на стадии (v);

(vii) выделение изолята нативного рапсового белка из концентрированной и промытой водной жидкости, полученной на стадии (vi), путем сушки.

В указанном выше способе аскорбиновую кислоту или ее производное и сульфит добавляют до, во время или после любой из стадий (i) или (ii), или (iii), или (iv), или (v), или (vi). Совместное использование аскорбиновой кислоты (производных) и сульфитов не сообщалось и не предлагалось в предшествующем уровне техники и, как дополнительно описано ниже, приводит к неожиданному эффекту.

Как указано выше, изолят рапсового белка получают из муки от холодного отжима рапсового масла, являющейся побочным продуктом производства рапсового масла.

Способ начинается со стадии экстракции (i), на которой рапсовую муку объединяют с водным раствором соли, например, от 0 до 5% хлорида натрия, при температуре от 4 до 75°C, более предпочтительно от 20 до 75°C и наиболее предпочтительно от 45 до 65°C. Предпочтительно на стадии (i) указанное смешивание осуществляют таким образом, чтобы соотношение между указанной мукой от холодного отжима рапсового масла и указанной водной жидкостью составляло от 1:2 до 1:30 (по массе). Предпочтительно соотношение муки и воды находится в диапазоне от 1:5 до 1:40, более предпочтительно от 1:5 до 1:20.

После периода в диапазоне от 5 минут до 2 часов раствор, богатый белком,

отделяют от нерастворимого материала на стадии разделения (ii). Раствор, богатый белком, в дальнейшем называется экстрактом.

Значение рН экстракта предпочтительно доводят до нейтрального, и экстракт дополнительно обрабатывают для осветления материала и удаления небелковых веществ. На стадии обезжиривания (iii) остаточный жир и образовавшиеся осадки удаляют посредством стадии разделения твердого вещества/жидкости (например, фильтрации или центрифугирования). Предпочтительно обезжиривание на стадии (iii) проводят с помощью центрифугирования.

Затем экстракт концентрируют и промывают на стадии (vi) ультрафильтрации/диафильтрации (УФ/ДФ). Стадия УФ/ДФ имеет целью концентрирование белка и удаление антипитательных факторов (например, полифенолов, остаточного фитата, глюкозинолатов). Концентрирование и промывание на стадии (vi) предпочтительно осуществляют посредством ультрафильтрации и диафильтрации.

Наконец, на стадии (vii) промытый концентрат может быть высушен в подходящей сушилке, такой как распылительная сушилка (одно- или многоступенчатая) с температурой на входе в диапазоне от 150 до 200°C и температурой на выходе в диапазоне от 50 до 100°C, что приводит к получению изолята рапсового белка.

В одном варианте осуществления аскорбиновая кислота или ее производное представляет собой L-аскорбиновую кислоту или L-аскорбат кальция, или L-аскорбат калия, или L-аскорбат натрия. В другом варианте осуществления сульфит представляет собой аммонийную или металлическую соль сульфита, бисульфита или метабисульфита. Неограничивающими примерами являются метабисульфит натрия или метабисульфит калия.

Количество аскорбиновой кислоты или ее производного может варьировать в широких пределах. Подходящими примерами являются случаи, когда количество аскорбиновой кислоты составляет от 0,05 до 5 г/кг или от 0,25 до 1 г/кг относительно смеси муки от холодного отжима рапсового масла и водной жидкости. Количество сульфита составляет от 0,01 до 0,5 г/кг или от 0,05 до 0,1 г/кг относительно смеси муки от холодного отжима рапсового масла и водной жидкости. Альтернативно, количества аскорбиновой кислоты и сульфита выражены в процентах по отношению к общей массе композиции. Следовательно, для аскорбиновой кислоты это может составлять от 0,005 до 0,5 масс.% или от 0,025 до 0,1 масс.%, а для сульфита это может составлять от 0,001 до 0,05 масс.% или от 0,005 до 0,01 масс.%.

Интересно, что комбинация аскорбиновой кислоты или ее производных с сульфитом привела к беспрецедентному эффекту. Например, применение метабисульфита

приводит к первоначальному удалению цвета, которое, однако, со временем не проявляется, а в некоторых случаях после продолжительной инкубации даже приводит к более темному цвету. С другой стороны, применение аскорбиновой кислоты приводит к меньшему первоначальному удалению цвета, но этот эффект более стабилен во времени и в конечном итоге приводит к существенно более низким значениям цвета. Когда в соответствии с изобретением аскорбиновую кислоту и метабисульфит объединяют, наблюдается эффект, при котором результирующий цвет рассматриваемого технологического потока ниже, чем у потока, тестируемого с отдельными компонентами. Примечательно, что значения L цвета, полученные согласно изобретению, как дополнительно определено во втором аспекте изобретения, значительно выше, чем те, о которых сообщалось для изолятов рапсового белка из предшествующего уровня техники.

В одном варианте осуществления стадии способа (i) – (vi) выполняют в течение 1-8 часов, предпочтительно в течение 3-5 часов, в течение которых наблюдается максимальная разница с необработанным контролем. В другом варианте осуществления стадии способа (i) – (vi) проводят в течение менее 4 часов, предпочтительно от 30 минут до 3,5 часов, в условиях, при которых цвет экстракта (выраженный в 100-L) и, следовательно, цвет конечного продукта, значительно ниже, чем у необработанного экстракта, но также ниже, чем у экстракта, обработанного аскорбиновой кислотой или сульфитом по отдельности.

Преимущество способа по первому аспекту заключается в том, что не наблюдается значительного уменьшения представляющих интерес белков, в частности, круциферин и напинов. Это особенно удивительно для напинов, которые, как известно, склонны к деградации. В указанных выше условиях концентрации напинов остаются выше 95% от начальной концентрации напинов в контроле.

Дополнительным преимуществом способа по первому аспекту является то, что необработанные прозрачные растворы изолята рапсового белка, полученные во время процесса, имеют тенденцию к формированию осадка темного цвета с течением времени, где это не происходит с образцами, полученными в ходе способа по изобретению.

Предпочтительно изолят рапсового белка получают способом без стадии фракционирования для разделения круциферин и напинов.

Предпочтительно изолят рапсового белка получают способом, в котором уровни напина и круциферина поддерживают по существу постоянными (то есть ни уровни напина (2S), ни круциферина (12S) не увеличиваются или уменьшаются целенаправленно).

Способ по настоящему изобретению отличается тем, что он хорошо подходит для

крупномасштабного применения. Следовательно, в одном варианте осуществления способ выполняют в масштабе по меньшей мере 500 кг, предпочтительно от 500 до 10 000 кг или от 1000 до 5000 кг.

Во втором аспекте изобретения предложен изолят нативного рапсового белка, содержащий от 40 до 65 масс.% крuciферинов и от 35 до 60 масс.% напинов, и имеющий растворимость по меньшей мере 88% в диапазоне pH от 3 до 10 при температуре $23\pm 2^\circ\text{C}$, который имеет в 1 масс.% растворе в 0,2 М фосфатном буфере при pH 6 и при $20\pm 2^\circ\text{C}$ значение L, составляющее от 88 до 98. Этот диапазон может быть достигнут с помощью способа по изобретению, и не был известен до настоящего времени. Типичные приемлемые поддиапазоны L для раствора 1 масс.% в воде составляют от 88,5 до 95, или от 89 до 93, или 91 ± 2 . Следовательно, выполняя способ по первому аспекту, то есть объединяя аскорбиновую кислоту или ее производные вместе с сульфитом во время приготовления изолята рапсового белка, получают продукт, который имеет более низкую окраску, то есть имеет более высокую белизну, чем любой изолят рапсового белка, доступный или известный на сегодняшний день. Это оказывает значительное положительное влияние на пригодность изолята рапсового белка в ряде областей применения.

В одном варианте осуществления изолят нативного рапсового белка содержит от 5 до 65% белка 12S рапса на основе сухого вещества, где присутствие 12S подтверждается нативным электрофорезом в полиакриламидном геле с синим окрашиванием. Предпочтительно изолят нативного рапсового белка содержит от 10 до 65%, наиболее предпочтительно от 15 до 65%, особенно от 25 до 65% и наиболее предпочтительно от 35 до 65% (на основе сухого вещества) рапсового белка 12S, где наличие 12S подтверждают посредством нативного ПАГЭ. Как указано выше, определенное содержание белков 12S не обязательно является таким же, как у крuciферинов, так как гексамер крuciферина 12S 300 кДа может диссоциировать на тримерные молекулы 7S 150 кДа. Предпочтительно изолят нативного рапсового белка по изобретению содержит менее 20% белка 7S рапса на основе сухого вещества.

В одном варианте осуществления изолят нативного рапсового белка имеет отношение крuciферинов к напинам (отношение К/Н) от 0,9 до 1,3.

В одном варианте осуществления изолят нативного рапсового белка имеет растворимость по меньшей мере 88%, предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 94% и наиболее предпочтительно по меньшей мере 96% при измерении в диапазоне pH от 3 до 10 при температуре $23\pm 2^\circ\text{C}$. Это также известно как индекс растворимых твердых веществ (SSI).

Для употребления в пищу человеком изолят нативного рапсового белка предпочтительно содержит низкий уровень соли. Это может быть установлено путем измерения электропроводности. Предпочтительно электропроводность изолята нативного рапсового белка в 2 масс.% водном растворе составляет менее 9000 мкС/см в диапазоне рН от 2 до 12. Более предпочтительно электропроводность изолята нативного рапсового белка в 2 масс.% водном растворе составляет менее 4000 мкС/см в диапазоне рН от 2,5 до 11,5. Для сравнения, электропроводность 5 г/л водного раствора хлорида натрия составляет около 9 400 мкС/см.

В другом варианте осуществления изолят нативного рапсового белка имеет уровень фитата менее 0,4 масс.%, более предпочтительно менее 0,3 масс.% и наиболее предпочтительно менее 0,15 масс.%.

В еще одном варианте осуществления изолят нативного рапсового белка имеет содержание белка по меньшей мере 90 масс.% (при расчете по методу Кьельдаля $N \times 6,25$) на основе массы сухого вещества, более предпочтительно по меньшей мере 94 масс.%, наиболее предпочтительно по меньшей мере 96 масс.% и особенно по меньшей мере 98 масс.%.

Предпочтительно изолят нативного рапсового белка является по существу негидролизированным. Под по существу негидролизированным подразумевается, что белок не является преднамеренно гидролизированным.

Преимущество изолята рапсового белка по второму аспекту изобретения заключается в том, что количество присутствующего сульфита ниже спецификации маркировки, указывающей 10 ч./млн. Изобретение позволяет регулировать количество аскорбиновой кислоты и сульфита, добавляемых во время процесса, и таким образом можно достичь высокой белизны, то есть высокого значения L, при одновременном контроле содержания сульфита в конечном продукте ниже 10 ч./млн, например, ниже 8 ч./млн или от 1 до 9 ч./млн или от 2 до 8 ч./млн. Такие значения могут быть достигнуты с использованием диапазонов, упомянутых в первом аспекте изобретения.

В третьем аспекте изолят нативного рапсового белка можно использовать в любых пищевых продуктах, будь то продукты для человека, домашних животных или ветеринарные продукты, в том числе в качестве пенообразователя для замены яичных белков, в качестве эмульгирующего агента для замены, например, яичного желтка в майонезе и просто в качестве пищевого компонента, обеспечивающего превосходный аминокислотный профиль. Следовательно, изобретение предусматривает использование изолята нативного рапсового белка в соответствии со вторым аспектом изобретения в качестве пенообразователя для пищевых продуктов или в качестве эмульгатора для

пищевых продуктов. Следовательно, изобретение обеспечивает пищевой продукт или корм для домашних животных, содержащий изолят нативного рапсового белка в соответствии со вторым аспектом изобретения. Изолят рапсового белка по настоящему изобретению может функционировать в качестве белковой добавки в пищевых продуктах, таких как батончики, шоколад, мороженое и тому подобное.

ПРИМЕРЫ

Методы испытаний

Содержание белка

Содержание белка определяли по методу Кьельдаля, Официальная методика АОАС 991.20 Азот (Общий) в молоке, используя коэффициент преобразования 6,25, чтобы определить количество белка (масс.%).

Измерение цветности с помощью УФ-спектрофотометра

Значения цветности определяли с использованием УФ-спектрофотометра (ридер планшетов TECAN Infinite M1000 Pro) с 96-луночными планшетами. Объем образца на лунку составлял 275 мкл. Образцы очищали фильтрацией (0,45 мкм) перед измерением оптической плотности.

Измеренное поглощение при 400-700 нм (интервал 10 нм, с поправкой на холостую пробу (вода Milli-Q)) было преобразовано в значения L с использованием формул, описанных в DIN 5033, Часть 3 и DIN 6174. Для расчета L использовали источник света D65 и стандартные спектральные функции «дополнительного стандартного колориметрического наблюдателя CIE 1964» с углом наблюдения 10°. Для сравнения 100-L между различными образцами использовали экстраполированные значения 100-L, поскольку L (или 100-L) не имеет линейной зависимости от концентрации образца.

Образцы отбирали из потоков в процессе производства при равном значении pH без дальнейшего разбавления.

Измерение цвета с использованием спектрофотометра Hunterlab

Цветовой спектрофотометр	Hunterlab UV VIS, D-SV032
Вспомогательные материалы	Держатель кювет, помещенный между сферой и линзой
Режим	RTRAN-регулярная трансмиссия, УФ-фильтр номинальный
Распределительная пластина	Стандартная, 25,400 мм
Стандартизация	Стандартный образец белого цвета
Холостая проба	Кювета, заполненная буферным раствором
Кювета с образцом	Brandt 7590.05, пластиковая, 10x10 мм

Со спектрофотометром Hunterlab цвет определяется как фиксированная точка в трехмерном пространстве. Параметры были измерены как значения L, a и b.

Значение L: степень насыщенности белого цвета в образце: значение 100 означает белый цвет, а значение 0 означает черный цвет.

Значение a: степень насыщенности от зеленого до красного цвета: положительное значение означает насыщенность красным цветом, а отрицательное значение означает насыщенность зеленым цветом.

Значение b: степень насыщенности от желтого до синего цвета: положительное значение означает насыщенность желтым цветом, а отрицательное значение означает насыщенность синим цветом.

YI E313: Коэффициент желтизны (ASTM E313); математический расчет, который применяют для выражения желтизны образца: чем выше значение, тем более желтым является образец.

Для определения белизны, полученной после обесцвечивания, предпочтительно применяют измеренные значения L.

Электропроводность

Электропроводность изолята нативного рапсового белка в 2 масс.% водном растворе измеряли с использованием измерителя электропроводности Hach sensION+ EC71.

Испытание растворимости

Приведенный ниже тест на растворимость адаптирован Morr et al. (J. Food Sci. (1985) 50, 1715-1718), различие заключается в использовании воды вместо 0,1 М хлорида натрия.

Помещали навеску белкового порошка, достаточную для обеспечения 0,8 г белка, в стакан. К порошку добавляли небольшое количество деминерализованной воды, и смесь перемешивали до образования однородной пасты. Затем добавляли дополнительное количество деминерализованной воды до общей массы 40 г (получая дисперсию белка 2 масс.%). Дисперсию медленно перемешивали в течение не менее 30 мин с использованием магнитной мешалки. После этого определяли pH, и доводили до необходимого уровня (2, 3, 4 и т.д.) с помощью гидроксида натрия или соляной кислоты. Значение pH дисперсии измеряли и периодически корректировали в течение 60 минут перемешивания. После 60 минут перемешивания аликвоту дисперсии белка оставляли для определения содержания белка (анализ по Кьельдалю). Другую часть образца центрифугировали при 20 000 g в течение 2 минут. Надосадочную жидкость и осадок разделяли после центрифугирования.

Содержание белка также определяли анализом по Кьельдалю.

Растворимость белка (%) = (белок в надосадочной жидкости/ белок в общей дисперсии) x 100.

Доступны альтернативные методы определения растворимости, и в некоторых случаях используют буферы, такие как борат-фосфатный буфер в WO 2011/057408. Однако такие значения несопоставимы со значениями, полученными в настоящем приложении, которые определяют при отсутствии буфера.

Определение молекулярной массы с помощью нативного электрофореза в полиакриламидном геле с синим окрашиванием

В случае нативного ПАГЭ заряд белка оказывает влияние на электрофоретическую подвижность. В случае нативного ПАГЭ с синим окрашиванием (и в отличие от прозрачного нативного ПАГЭ) краситель Кумасси бриллиантовый синий обеспечивает необходимые заряды для белковых комплексов для электрофоретического разделения. Белки растворяли в 500 мМ растворе хлорида натрия. Поскольку высокие концентрации соли несовместимы с электрофоретическим разделением, образец разбавляли в 10 раз водой (конечная концентрация соли: 50 мМ). Использовали Кумасси® G-250 (SimplyBlue™, ThermoFischer Scientific), и гели сканировали с помощью прибора для вырезания участков геля ExQuest™ (BioRad). Наблюдали результирующие полосы после проведения нативного ПАГЭ с синим окрашиванием. Можно ожидать, что полосы около 14 кДа указывают на 2S, около 150 кДа указывают на 7S и около 300 кДа указывают на 12S белки.

Отношение круциферин/ напин (К/Н)

Отношение К/Н определяли с помощью анализа методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Образцы растворяли в 500 мМ солевом растворе хлорида натрия и анализировали с помощью HP-SEC (высокоэффективной эксклюзионной хроматографии), используя тот же раствор в качестве подвижной фазы. Детекцию осуществляли путем измерения УФ-поглощения при 280 нм. Относительный вклад круциферина и напина (%) рассчитывали по отношению площади пика каждого белка к сумме площадей пиков обоих белков.

Уровень фитатов

Фитаты измеряли в Eurofins с использованием методики QD495, основанной на Ellis et al. (Anal. Biochem. (1977) 77, 536-539).

Сравнительный Пример 1

Приготовление изолята рапсового белка из муки от холодного отжима рапсового масла при отсутствии добавленных обесцвечивающих веществ

Изолят рапсового белка получали из муки от холодного отжима рапсового масла с содержанием масла менее 15% в пересчете на сухое вещество, очищали и обрабатывали при температуре ниже 75°C.

На стадии экстракции муку от холодного отжима рапсового масла смешивали с водным раствором соли (от 1 до 5% хлорида натрия) при температуре от 40 до 75°C. Соотношение муки и водного раствора соли находилось в диапазоне от 1:5 до 1:20. Примерно через 30 минут - 1 час богатый белком раствор (экстракт) отделяли от нерастворимого материала. Значение рН экстракта доводили до нейтрального, и экстракт дополнительно обрабатывали для осветления материала и удаления небелковых веществ. На стадии обезжиривания остаточный жир удаляли с помощью стадии разделения жидкость/жидкость с использованием центрифугирования. Небелковые вещества удаляли путем доведения рН материала до нейтрального значения в присутствии соли, с которой осаждается фитат (например, хлорида кальция). Образовавшийся осадок удаляли на стадии разделения твердого вещества/ жидкости (например, с помощью мембранного фильтр-пресса или центрифугирования), на которой удаляют примеси в форме твердой соли (например, фитат кальция). Затем экстракт концентрировали и промывали на стадии ультрафильтрации/ диафильтрации (УФ/ДФ). Наконец, промытый концентрат сушили в распылительной сушилке с температурой на входе в диапазоне от 150 до 200°C и температурой на выходе в диапазоне от 50 до 100°C, с получением изолята рапсового белка. Было подготовлено и испытано несколько партий.

Электропроводность полученных изолятов нативного рапсового белка в 2% растворе составляла менее 4000 мкС/см в диапазоне рН от 2,5 до 11,5.

Нативный ПАГЭ с синим окрашиванием: Основные полосы наблюдались в области примерно 300 кДа, между маркерами с молекулярной массой 242 кДа и 480 кДа (Фигура 1). Некоторое окрашивание было видно в виде мазка при более низкой молекулярной массе (150 кДа и ниже). Никаких четких полос при 150 кДа не наблюдалось. На основании этих результатов рапсовый продукт содержит форму 12S круциферина.

Полученный изолят нативного рапсового белка содержал круциферины в диапазоне от 40 до 65% и набины в диапазоне от 35 до 60%.

Полученный изолят нативного рапсового белка содержал менее 0,26 масс.% фитата.

Полученные нативные изоляты рапсового белка имели растворимость по меньшей мере 88% при измерении в диапазоне рН от 3 до 10 при температуре 23±2°C, как показано для двух партий в приведенной ниже таблице.

pH	3	4	5	6	7	8	9	10
Растворимость (%) Образец 1	98	96	89	95	95	97	97	98
Растворимость (%) Образец 2	102,5	97,5	94,3	93,9	97,0	93,0	94,0	99.8

Пример 1

Приготовление изолята рапсового белка из муки от холодного отжима рапсового масла в присутствии L-аскорбиновой кислоты или L-цистеина

Часть процедуры экстракции, как описано в Сравнительном примере 1, повторяли пятью различными способами. После удаления осадка на стадии разделения твердого вещества и жидкости и перед концентрированием и промыванием экстракт разбавляли 9:1 по массе 2% раствором хлорида натрия в воде и следующими обесцвечивающими агентами (все растворы с pH 5,9):

I. Нет (контроль)

II. L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг, конечная концентрация)

III. L-аскорбиновая кислота (1,0 г/кг, конечная концентрация)

IV. L-цистеин (0,5 г/кг, конечная концентрация)

V. Цистеин (1,0 г/кг, конечная концентрация)

Инкубацию проводили на встряхиваемой водяной бане (55°C; 0-5 ч) в закрытых пробирках Greiner объемом 50 мл (22 г образца на пробирку, одна пробирка на концентрацию). Результаты измерения цветности с использованием метода, описанного выше, с УФ-спектрофотометром приведены на Фигуре 1. Было отмечено, что цветность контроля увеличивалась во время инкубации (+ 20% через 5 часов), тогда как цветность экстрактов с L-аскорбиновой кислотой уменьшалась в течение первых 2,5 часов и была стабильной между 2,5 и 5 часами, а цветность экстрактов с L-цистеином первоначально уменьшалась, и постепенно снова увеличивалась для образца 0,5 г/кг и был стабильной для образца 1,0 г/кг.

Выходы круциферинов и напинов были определены в $t = 0$ ч и в $t = 5$ ч, см. Таблицу ниже.

Что касается круциферинов, во время инкубации не наблюдалось соответствующего снижения выхода для всех условий испытаний (от -2% до + 1%). Для напинов не наблюдалось значительного снижения выхода для контроля и образцов с L-аскорбиновой кислотой, тогда как для образцов, инкубированных с L-цистеином, наблюдались потери (-12% и -22%) через 5 часов.

Таблица: Выход круциферина и напина во время инкубации осветленного экстракта без добавок (контроль) или с L-аскорбиновой кислотой или L-цистеином. Концентрации круциферина и напина при $t = 0$ ч были установлены на уровне 100%, при этом $[\text{круциферин}]_{t=0 \text{ ч}} = 7,1 \text{ мг/г}$ и $[\text{напин}]_{t=0 \text{ ч}} = 5,7 \text{ мг/г}$.

Добавка	Круциферины (%)		Напины (%)	
	t=0 ч	t=5 ч	t=0 ч	t=5 ч
Нет	100	101	100	98
L-аскорбиновая кислота, 0,5 г/кг	99	100	99	96
L-аскорбиновая кислота, 0,5 г/кг	99	100	99	96
L-цистеин, 0,5 г/кг	99	99	99	88
L-цистеин, 1,0 г/кг	99	98	98	78

Пример 2

Приготовление изолята рапсового белка из муки от холодного отжима рапсового масла в присутствии L-аскорбиновой кислоты и/или метабисульфита натрия

Процедуру, описанная в Сравнительном примере 1, повторяли семью различными способами с различными концентрациями в экстракционной жидкости следующих добавок при pH 5,9:

I. Нет (контроль)

II. L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг)

III. Метабисульфит натрия (0,1 г/кг)

IV. L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,1 г/кг)

V. L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,05 г/кг)

VI. L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,1 г/кг)

VII. L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,05 г/кг)

Количество сеансов анализа, выполненных для каждой комбинации L-аскорбиновой кислоты и метабисульфита натрия, было таким, как указано в таблице ниже.

Натрия метабисульфит (г/кг в экстракционной жидкости)	L-аскорбиновая кислота (г/кг в экстракционной жидкости)		
	0	0,25	0,5
0	2	-	1
0,05	-	3	1
0,1	1	1	1

После удаления осадка на стадии разделения твердого вещества и жидкости и перед концентрированием и промыванием проводили инкубацию на встряхиваемой водяной бане (56°C; 100 об./мин; 0-3 ч) в пробирках Greiner вместимостью 50 мл (с закрытой крышкой). Образцы для HP-SEC и анализа цветности были взяты из

инкубационной пробирки в $t = 0$ ч, $t = 1,5$ ч и $t = 3$ ч. При $t = 3$ ч образцы хранили в замороженном виде (-20°C). После 10 недель хранения эксперимент продолжали путем оттаивания и центрифугирования (10 000 g; 5 мин) образцов и продолжения инкубации, как описано выше. Образцы для анализа цветности отбирали каждые ~ 2 ч. Результаты анализа цветности с использованием метода, описанного выше, с помощью УФ-спектрофотометра приведены на Фигуре 2.

Определяли выход по напинам (в %) при инкубации осветленного экстракта без добавки (контроль) или с L-аскорбиновой кислотой и/или метабисульфитом натрия при $t=0$ ч, $t=1,5$ ч и при $t=3$ ч. Концентрация напина в контроле при $t = 0$ ч была установлена на уровне 100%, при этом $[\text{напин}]_{t=0\text{ ч}} = 7,55$ мг/г. См. таблицу ниже.

Добавка	t=0 ч	t=1,5 ч	t=3 ч
Нет	100	100	100
L-аскорбиновая кислота, 0,5 г/кг	102	102	102
Натрия метабисульфит (0,1 г/кг)	100	100	99
L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) + натрия метабисульфит (0,05 г/кг)	99	98	99
L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) + натрия метабисульфит (0,1 г/кг)	100	97	98
L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) + натрия метабисульфит (0,05 г/кг)	97	99	100
L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) + натрия метабисульфит (0,1 г/кг)	101	99	98

Стандартные отклонения для анализа цветности, круциферина, напина и отношения круциферин/напин, полученные для центральной точки (L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,05 г/кг)), были следующими.

Время (ч)	Стандартное отклонение (%)			
	Цветность	Круциферин	Напин	Круциферин/Напин
0	1,6	0,7	2,0	2,1
1,5	1,1	2,1	2,9	0,8
3	0,6	2,1	1,7	0,9
5,3	1,1	Не измеряли	Не измеряли	Не измеряли
7,3	0,5	Не измеряли	Не измеряли	Не измеряли
9,7	0,5	Не измеряли	Не измеряли	Не измеряли

Что касается цветности, было отмечено, что метабисульфит натрия приводит к первоначальному удалению цветности (то есть более низкому значению в 100-L), которое не является постоянным во времени, фактически значение 100-L превосходит таковое у необработанного контроля после 9 часов инкубации. Для L-аскорбиновой кислоты наблюдается меньшее начальное удаление цветности, однако этот эффект более стабилен во времени и в конечном итоге приводит к значению 100-L, которое существенно ниже, чем в контроле. Для комбинации L-аскорбиновой кислоты и метабисульфита натрия

наблюдается дополнительный эффект. Это относится ко всем протестированным комбинациям в течение первых трех часов, т.е. L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,05 г/кг), L-аскорбиновая кислота (0,25 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,1 г/кг), L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,05 г/кг) и L-аскорбиновая кислота (0,5 г/кг) плюс метабисульфит натрия (0,1 г/кг), в течение 3 часов. Для комбинаций, где L-аскорбиновая кислота составляет по меньшей мере 0,5 г/кг, и/или метабисульфит натрия составляет по меньшей мере 0,1 г/кг, эффект наблюдался также в течение последующих 7 часов. Обычно относительная разница цветности между контролем и экстрактами, обработанными как L-аскорбиновой кислотой, так и метабисульфитом натрия, была максимальной (приблизительно 50%) между 3-5 часами инкубации.

Для напинов не наблюдалось значительного снижения выхода ни для контроля, ни для какой-либо из испытанных концентраций L-аскорбиновой кислоты и/или метабисульфита натрия, все они оставались значительно выше 95% начальной концентрации напина в контроле в течение первых трех часов после инкубации.

Пример 3

Приготовление изолята рапсового белка из муки от холодного отжима рапсового масла в присутствии L-аскорбиновой кислоты и метабисульфита натрия

В серии препаратов процедуру, описанную в Сравнительном примере 1, повторяли в масштабе экспериментальной установки, при этом L-аскорбиновую кислоту и метабисульфит натрия добавляли на стадии экстракции (проценты в приведенной ниже таблице показаны относительно массы смеси муки из масличных семян рапса и водного раствора соли). Цветность высушенного продукта двух партий определяли, используя метод, описанный выше, с помощью спектрофотометра Hunterlab. Растворы 1% готовили в 0,2 М фосфатном буфере при рН 6. Перед измерением образцы фильтровали на фильтре 0,45 мкм для удаления частиц, если они присутствовали. Измеренные значения были следующими.

№	L-аскорбиновая кислота (%)	Натрия метабисульфит (%)	L	a	B	YI E313
1	0	0	87,33	-2,64	22,13	44,72
2	0	0	87,98	-3,36	24,15	48,03
3	0,044	0,006	91,08	-4,74	22,41	41,79
4	0,044	0,006	89,45	-4,34	22,72	43,51
5	0,044	0,006	88,69	-4,65	23,81	45,90
6	0,044	0,006	89,13	-4,69	24,54	47,16

7	0,044	0,006	89,66	-4,93	24,09	45,78
8	0,088	0,0082	92,87	-5,86	24,25	43,79
9	0,088	0,0082	93,43	-8,7	32,13	56,95
10	0,088	0,0082	92,38	-8,58	33,57	60,57
11	0,088	0,0082	93,32	-5,78	23,8	42,75

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения изолята нативного рапсового белка, включающий стадии:

(i) смешивание муки от холодного отжима рапсового масла с водной жидкостью при температуре от 45 до 65°C;

(ii) отделение водной жидкости от смеси, полученной на стадии (i);

(iii) обезжиривание водной жидкости, полученной на стадии (ii);

(iv) доведение рН обезжиренной водной жидкости, полученной на стадии (iii), до нейтрального значения путем добавления кислоты или основания, и смешивание с осадителем для получения осадка, где указанный осадитель включает соль магния, цинка, железа или кальция;

(v) удаление осадка, полученного на стадии (iv), для получения водной жидкости;

(vi) концентрирование и промывание водной жидкости, полученной на стадии (v);

(vii) выделение изолята нативного рапсового белка из концентрированной и промытой водной жидкости, полученной на стадии (vi), путем сушки;

где аскорбиновую кислоту или ее производное и сульфит добавляют до, во время или после любой из стадий (i) или (ii), или (iii), или (iv), или (v), или (vi).

2. Способ по п.1, где указанная аскорбиновая кислота или ее производное представляет собой L-аскорбиновую кислоту или L-аскорбат кальция, или L-аскорбат калия, или L-аскорбат натрия, и где указанный сульфит представляет собой аммонийную или металлическую соль сульфита, бисульфита или метабисульфита.

3. Способ по п.1, где указанный сульфит представляет собой метабисульфит натрия или метабисульфит калия.

4. Способ по любому из предыдущих пунктов, где количество L-аскорбиновой кислоты составляет от 0,05 до 5 г/кг указанной смеси муки от холодного отжима рапсового масла и водной жидкости, а количество сульфита составляет от 0,01 до 0,5 г/кг указанной смеси муки от холодного отжима рапсового масла и водной жидкости.

5. Способ по п.4, где количество L-аскорбиновой кислоты составляет от 0,25 до 1 г/кг указанной смеси муки от холодного отжима рапсового масла и водной жидкости, а количество сульфита составляет от 0,05 до 0,1 г/кг от указанной смеси муки от холодного отжима рапсового масла и водной жидкости.

6. Изолят нативного рапсового белка, содержащий от 40 до 65 масс.% круциферинов и от 35 до 60 масс.% набинов и имеющий растворимость по меньшей мере 88% в диапазоне рН от 3 до 10 при температуре 23±2°C, который имеет в 1 масс.% растворе в 0,2 М фосфатном буфере при рН 6 и при температуре 20 ± 2°C значение L,

составляющее от 88 до 98.

7. Изолят нативного рапсового белка по п.6, содержащий от 5 до 65% белка рапса 12S на основе сухого вещества, где присутствие 12S подтверждается нативным гель-электрофорезом в полиакриламидном геле с синим окрашиванием.

8. Изолят нативного рапсового белка по любому из пп.6-7, имеющий электропроводность в 2 масс.% водном растворе менее 9000 мкС/см в диапазоне рН от 2 до 12.

9. Изолят нативного рапсового белка по любому из пп.6-8, содержащий менее 20% белка рапса 7S на основе сухого вещества.

10. Изолят нативного рапсового белка по любому из пп.6-9 с отношением круциферин/напин в диапазоне от 0,9 до 1,3.

11. Изолят нативного рапсового белка по любому из пп.6-10 с уровнем фитата менее 0,4 масс.%.

12. Изолят нативного рапсового белка по любому из пп.6-11 с растворимостью по меньшей мере 94% при измерении в диапазоне рН от 3 до 10 при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

13. Изолят нативного рапсового белка по любому из пп.6-12 с уровнем сульфита от 1 до 9 ч./млн.

14. Применение изолята нативного рапсового белка по любому из пп.6-13 в пищевых продуктах.

15. Пищевой продукт или корм для домашних животных, содержащий изолят нативного рапсового белка по любому из пп.6-13.

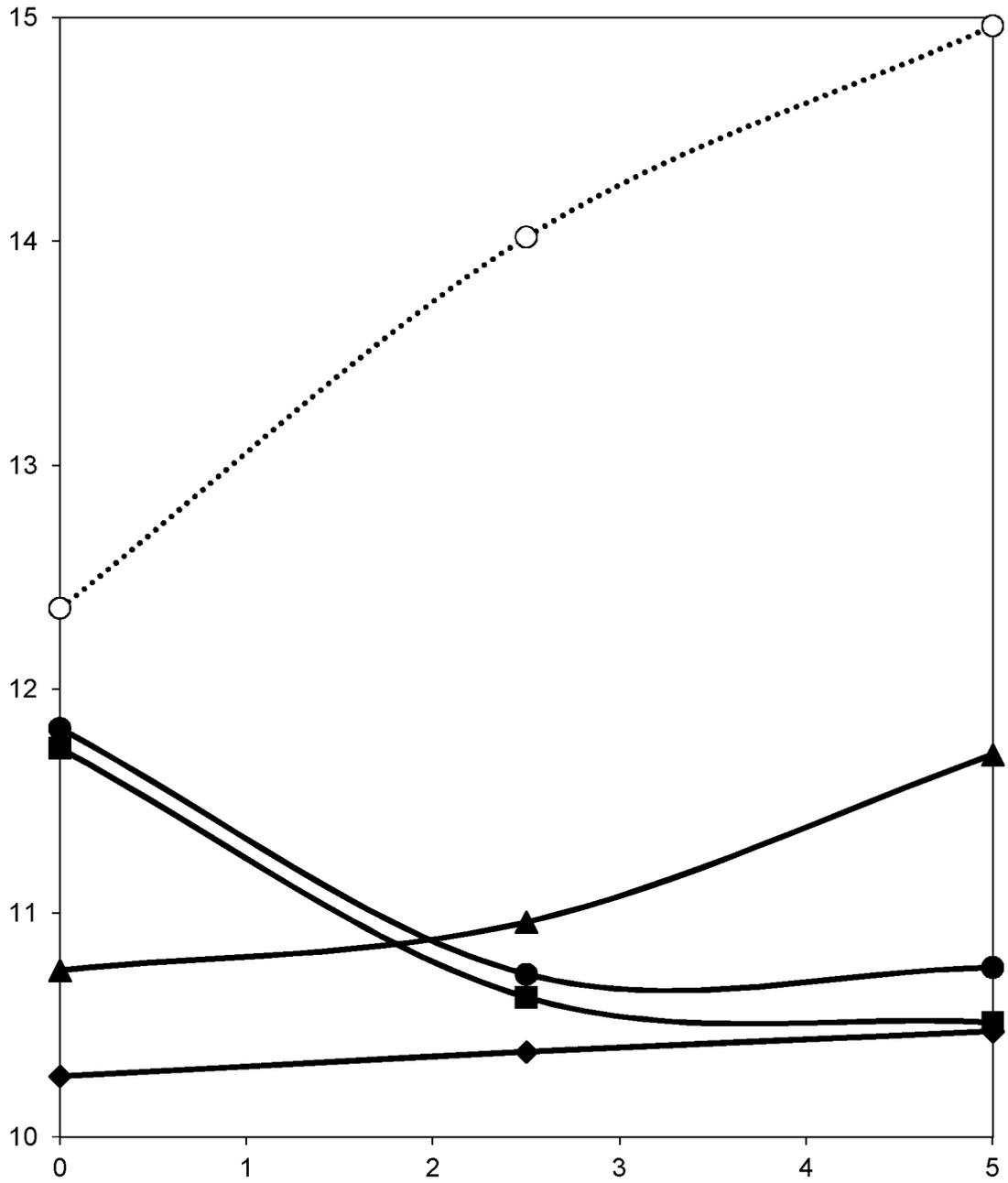


Figure 1

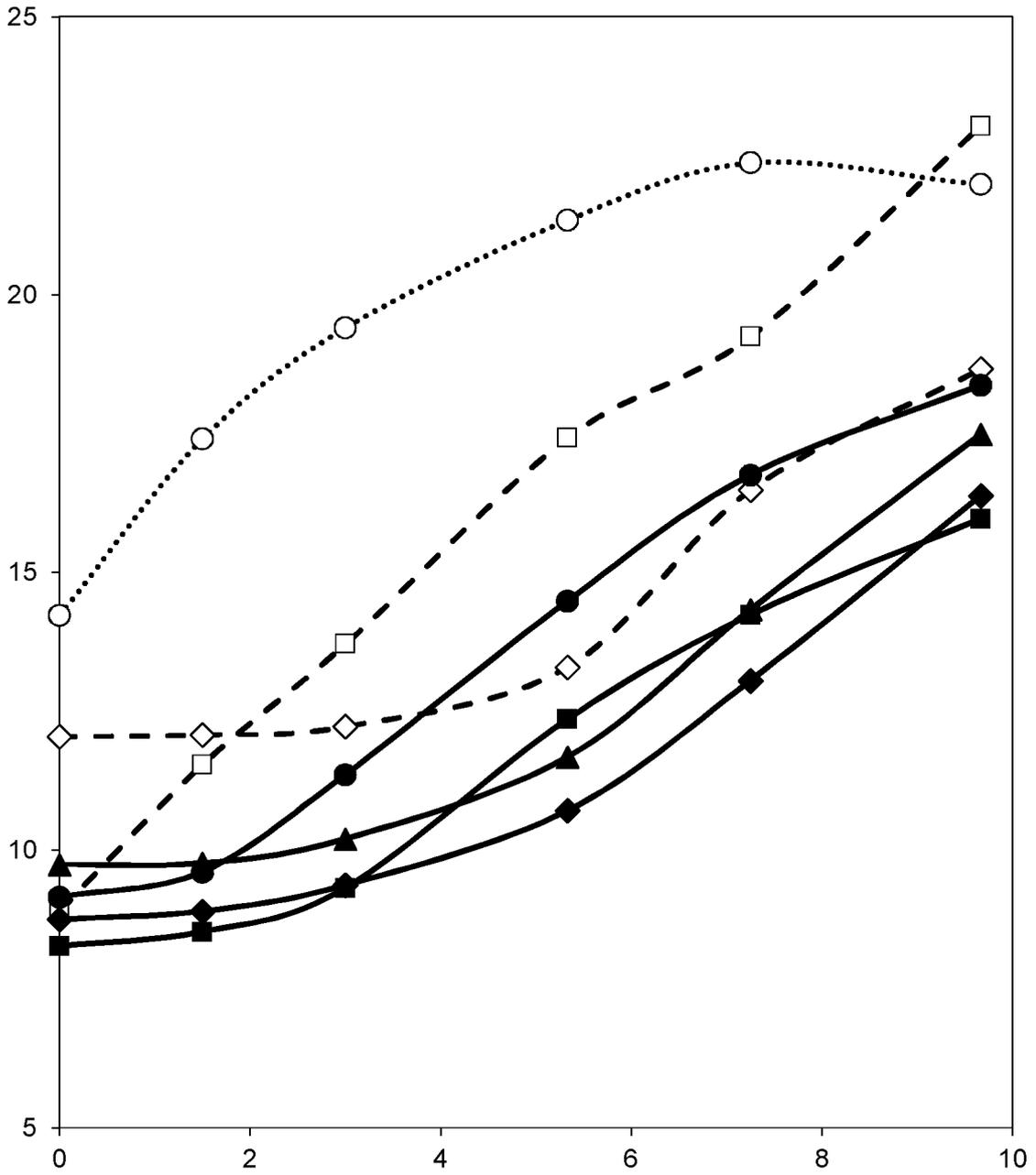


Figure 2