

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192697 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.15

(51) Int. Cl. A23J 1/00 (2006.01)
A23J 3/14 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.25

(54) ДИАФИЛЬТРАЦИЯ

(31) 2023197

(32) 2019.05.24

(33) NL

(86) PCT/NL2020/050336

(87) WO 2020/242302 2020.12.03

(71) Заявитель:
КООПЕРАТИ КОНИНКЛЕЙКЕ
АВЕБЕ У.А. (NL)

(72) Изобретатель:

Хабейх Нарваэс Давид Игнасио,
Тьялма Либбе Фукес, Спелбринк
Робин Эрик Якобус, Лаус Марк
Кристиан (NL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложен способ выделения нативного белка клубнеплодов путем предварительной обработки воды после переработки клубнеплодов и диафильтрации с использованием солевого раствора. Преимущество данной последовательности стадий в том, что белок стабилизируется при диафильтрации, тем самым повышается эффективность способа, а также качество белка и его выход.

A1

202192697

202192697

A1

ДИАФИЛЬТРАЦИЯ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Спрос на вегетарианские и веганские аналоги традиционных продуктов питания возрастает, в частности, ввиду возросшего осознания экологической нагрузки, обусловленной производством мясных продуктов питания. Однако белки растительного происхождения до сих пор не могут заменить белки животного происхождения по ряду причин. Одна из причин заключается в том, что зачастую белки растительного происхождения необходимо выделять и перерабатывать до момента приготовления продуктов питания на их основе.

Картофельный белок является широко доступным ввиду того, что картофель перерабатывают в больших количествах для получения крахмала, а также различных картофельных продуктов. Картофельный белок имеет аминокислотный состав, что делает его идеально пригодным для употребления в пищу. Однако выделение картофельного белка надлежащего качества является трудоемким процессом.

Картофельный белок обычно выделяют из побочных продуктов производства крахмала, которые получают путем измельчения в порошок или приготовления пюре из цельного картофеля с последующим выделением крахмала. Полученная жидкость содержит картофельный белок, который можно выделить различными способами с целью получения нативного или коагулированного белка. Коагулированный белок может быть получен обычными способами, однако его недостатками является отсутствие функциональности и растворимости. Поэтому нативный белок более предпочтителен для применения во многих пищевых продуктах.

Однако выделенный нативный картофельный белок зачастую имеет неприятный привкус и чрезмерную окраску, что затрудняет его употребление в пищу. Данная проблема может быть решена путем абсорбции или хроматографии, как например, адсорбция в кипящем слое, мембранная абсорбция или ионообменная хроматография. Однако эти способы дороги и трудоемки, особенно при применении в промышленном масштабе, поскольку они требуют ряд предварительных действий и должны быть выполнены при высокой концентрации с целью достижения приемлемой эффективности.

Также применяют другие способы выделения нативного белка. В разных условиях применяют различные мембранные способы, как например, ультрафильтрация и диафильтрация. Однако достаточно сложно выделить белок надлежащего качества путем

применения (только) таких способов, поскольку белок зачастую недостаточно чистый. Кроме того, недостатком мембранных способов является засорение мембраны, что не позволяет применять их в промышленных масштабах. При диафильтрации белок имеет склонность к агрегированию и осаждению, что исключает применение диафильтрации в качестве эффективного промышленного способа.

Более универсальные способы выделения белка из побочных продуктов производства крахмала повысили бы доступность картофельного белка и, таким образом, позволили бы повысить доступность функционально пригодного растительного белка, тем самым увеличивая экологичность использования пищевых ресурсов. В настоящем изобретении предложен оптимизированный способ выделения нативного картофельного белка с применением диафильтрации, который может быть реализован в промышленном масштабе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1 – растворимость картофельного белка при различных значениях pH и удельной проводимости.

ФИГ. 2 – растворимость картофельного белка при pH = 6 и pH = 7 и различной удельной проводимости под действием механических напряжений.

ФИГ. 3 – график зависимости удельной производительности от концентрации белка при первичной и вторичной диафильтрации согласно примеру 6.

ФИГ. 4 – растворимость общего изолята картофеля при различной удельной проводимости.

ФИГ. 5 – растворимость общего изолята картофеля при различной удельной проводимости.

ФИГ. 6 – общий белковый изолят, включающий все белковые фракции, которые также присутствуют в клубнеплоде (микрофильтрованный картофельный сок, MF-PFJ). Стандарты белка L; дорожка 1: Пример 4, эксп. 9 (микрофильтрованный картофельный сок); дорожка 2: Пример 4, эксп. 10 (микрофильтрованный картофельный сок); дорожка 3: Пример 4, эксп. 11 (микрофильтрованный картофельный сок); дорожка 4: Пример 5 (микрофильтрованный картофельный сок); дорожка 5: Пример 5, конечный продукт (диафильтрационный ретентат); дорожка 6: Пример 4, эксп. 9, конечный продукт (сухой); дорожка 7: Пример 4, эксп. 10, конечный продукт (сухой); дорожка 8: Пример 4, эксп. 11, конечный продукт (сухой).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложен способ выделения нативного белка клубнеплодов, включающий:

5 а) переработку по меньшей мере одного клубнеплода с получением воды после переработки клубнеплодов, содержащей нативный белок клубнеплодов;

б) предварительную обработку указанной воды после переработки клубнеплодов, включающую одну или более из следующих стадий:

ба) концентрирование, и/или

10 бб) разбавление, и/или

бв) регулирование pH, и/или

бг) флокуляцию, /или

бд) термическую обработку, и/или

бе) удаление твердых частиц,

15 где в результате предварительной обработки удельная проводимость предварительно обработанной воды после переработки клубнеплодов, содержащей нативный белок клубнеплодов, составляет $2\text{--}20\text{ мСм}\cdot\text{см}^{-1}$;

в) стадию диафильтрации предварительно обработанной воды после переработки клубнеплодов с использованием солевого раствора, удельная проводимость
20 которого составляет по меньшей мере $5\text{ мСм}\cdot\text{см}^{-1}$, с помощью $5\text{--}300\text{ кДа}$ мембраны; с получением, таким образом, указанного изолята белка клубнеплодов в качестве диафильтрационного ретентата.

Преимущество настоящего способа заключается в том, что нативный белок клубнеплодов может быть выделен в большом количестве из различных технологических
25 потоков. Это может быть достигнуто за счет высокой эффективности, низких потерь белка, низкой экологической нагрузки, низкой стоимости и относительно небольшого количества потоков отходов, что позволяет получить белок с высокой растворимостью, высокой чистотой и неизменными функциональными свойствами.

30 Способ согласно настоящему изобретению

Настоящий способ направлен на выделение нативного белка клубнеплодов. В данном контексте клубнеплод включает структуры, которые также можно назвать корнеплодом. Клубнеплод по своей природе содержит белок; предпочтительные типы

клубнеплодов также богаты крахмалом, как например клубнеплоды, используемые для выделения крахмала.

В данном контексте клубнеплод предпочтительно включает картофель (*Solanum tuberosum*), сладкий картофель (*Ipomoea batatas*), кассаву (включая *Manihot esculenta*, син. *M. utilissima*, также называемую маниока, тапиока или юка, а также включая *M. palmata*, син. *M. dulcis*, также называемую маниок сладкий), ямс (*Dioscorea spp*) и/или таро (*Colocasia esculenta*). Более предпочтительно клубнеплод включает картофель, сладкий картофель, кассаву или ямс, еще более предпочтительно клубнеплод включает картофель, сладкий картофель или кассаву, еще более предпочтительно клубнеплод включает картофель или сладкий картофель, и наиболее предпочтительно клубнеплод включает картофель (*Solanum tuberosum*).

Предпочтительно белок клубнеплодов включает белок картофеля, белок сладкого картофеля, белок кассавы, белок ямса и/или белок таро. Белок картофеля предпочтительнее. Картофель является клубнеплодом растения *Solanum tuberosum*, которое имеет множество разновидностей. Выделение белка согласно настоящему способу можно проводить с любым сортом картофеля. Сюда входят разновидности, предназначенные для крахмальной промышленности (крахмальный картофель), а также разновидности, предназначенные для потребления человеком (потребительский картофель).

Все сорта клубнеплодов содержат нативный белок клубнеплодов. Например, нативный белок картофеля можно разделить на три класса: (i) семейство пататина, высокомолекулярные кислые гликопротеины с молекулярной массой 43 кДа (с процентным содержанием картофельного белка 40–50 масс.%), (ii) основные ингибиторы протеазы с молекулярной массой 5–25 кДа (с процентным содержанием картофельного белка 30–40 масс.%) и (iii) другие белки, преимущественно белки с высокой молекулярной массой (с процентным содержанием картофельного белка 10–20 масс.%).

Ингибитор протеазы, в соответствии с определением в настоящей заявке, представляет собой белок корнеплода или клубнеплода, предпочтительно белок картофеля, который в нативной форме способен ингибировать протеазную активность протеаз. Общеизвестно, какой белок корнеплода или клубнеплода считается ингибитором протеазы. В данном контексте ингибитор протеазы относится к фракции белка корнеплода или клубнеплода, в которой по меньшей мере 80 масс.%, предпочтительно по меньшей

мере 85 масс.%, более предпочтительно по меньшей мере 90 масс.% всего белка имеет молекулярную массу по большей мере 35 кДа, как определено путем ДСН-ПААГ.

Пататин, в соответствии с определением в настоящей заявке, представляет собой белок корнеплода или клубнеплода, предпочтительно белок картофеля, который
5 представляет собой кислый гликопротеин, выполняющий функцию запасного белка в клубнеплоде. В промышленности по переработке корнеплодов и клубнеплодов обычно известно, какой из белков корнеплодов или клубнеплодов считается пататином. В данном контексте пататин относится к фракции белков корнеплодов или клубнеплодов, в которой
10 по меньшей мере 80 масс.%, предпочтительно по меньшей мере 85 масс.%, более предпочтительно по меньшей мере 90 масс.% всего белка имеет молекулярную массу по большей мере 35 кДа, как определено путем ДСН-ПААГ.

ДСН-ПААГ (электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)) является общеизвестным методом определения молекулярной массы белка.

15 Настоящий способ направлен на получение любого изолята нативного белка клубнеплодов. Согласно одному варианту реализации изолят нативного белка клубнеплодов представляет собой изолят нативного ингибитора протеазы. Согласно другому варианту реализации изолят нативного белка клубнеплодов представляет собой
20 изолят нативного пататина. Согласно данным вариантам реализации вода после переработки клубнеплодов может быть подвергнута стадии удаления одного конкретного белка картофеля перед стадией диафильтрации. Этого можно достичь путем абсорбционной хроматографии, селективного осаждения или любым другим известным
25 способом отделения одной белковой фракции от другой. Белковая фракция, которая остается в растворе при такой переработке, может быть впоследствии подвергнута стадии диафильтрации, в соответствии с определением в настоящей заявке.

Согласно наиболее предпочтительным вариантам реализации изолят белка клубнеплодов представляет собой изолят, содержащий нативный ингибитор протеазы и нативный пататин. Согласно другим наиболее предпочтительным вариантам реализации
30 изолят белка клубнеплодов представляет собой общий изолят нативного белка клубнеплодов.

Применяемый в настоящей заявке термин «общий изолят» относится к изоляту белка, содержащему ингибитор протеазы и пататин, а также любой другой белок, присутствующий в рассматриваемом клубнеплоде. Таким образом, общий изолят

нативного белка клубнеплодов можно определить как изолят, содержащий весь белок клубнеплодов в нативной форме.

Белковый изолят, полученный настоящим способом, представляет собой нативный белковый изолят. В данном контексте термин «нативный» означает, что
5 выделение белка из клубнеплода достигается без значительного воздействия на белок. Таким образом, нативный белок существенно не деградирует и существенно не денатурируется. То есть порядок аминокислот, трехмерная структура и функциональные свойства (как например, растворимость и/или эмульгирующие свойства) практически не нарушены по сравнению с белком, который содержится в клубнеплоде.

10 Степень нативности белка можно проверить в ходе эксперимента по увеличению растворимости. Ненативный белок в меньшей степени растворим в воде, в отличие от нативного белка. Растворимость белка можно определить путем диспергирования белка в воде, разделяя полученную жидкость на две фракции и подвергая одну из фракций центрифугированию при 800 g в течение 5 минут с
15 получением осадка нерастворенного материала и извлечения надосадочной жидкости. Растворимость определяют путем измерения содержания белка в надосадочной жидкости и в необработанном растворе и выражают содержание белка в надосадочной жидкости в процентах от его содержания в необработанном растворе. Определить содержание белка удобно путем измерения оптической плотности при 280 нм с помощью экспресс-
20 анализатора белка Sprint (компания CEM). В данном контексте белок считается нативным, если растворимость белка составляет по меньшей мере 55%, предпочтительно по меньшей мере 65%, более предпочтительно по меньшей мере 75%, еще более предпочтительно по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, наиболее предпочтительно по
25 меньшей мере 98%.

В данном контексте выделение означает получение белка либо в виде (чистого) раствора, либо в виде белкового порошка. Порошок можно получить из раствора путем высушивания раствора. Необязательно, высушиванию предшествует стадия концентрирования, как например обратный осмос, ультрафильтрация или
30 концентрирование вымораживанием. В данном контексте выделение означает, что белок клубнеплодов сохраняется в солюбилизированной форме до тех пор, пока изолят белка клубнеплодов не будет высушен с получением порошка нативного белка клубнеплода. Таким образом, выделение предпочтительно не включает стадию осаждения белка,

например, с помощью альгината, приводящую к выделению фракции осажденного белка, и последующую стадию ресольюбилизации осажденного белка, как например растворение фракции осажденного белка после выделения в водном растворителе, проводимое с получением нативного белка клубнеплодов. Осаждение белка и последующая
 5 ресольюбилизация могут привести к незначительной денатурации, и поэтому осажденный и ресольюбилизированный белок не является изолятом белка согласно настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению, изолят нативного белка клубнеплодов можно получить путем диафильтрации (ДФ) с использованием солевого раствора,
 10 имеющего удельную проводимость по меньшей мере $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Диафильтрация представляет собой процесс удаления низкомолекулярных соединений путем разбавления ретентата при удалении фильтрата с помощью диафильтрационных мембран, характеризующихся номинально задерживаемой молекулярной массой. Значение номинально задерживаемой молекулярной массы 10 кДа означает, что мембрана может
 15 удерживать из исходного раствора 90% молекул с молекулярной массой 10 кДа. Изолят нативного белка клубнеплодов получают в виде диафильтрационного ретентата. Соли, присутствующие в предварительно обработанной воде после переработки клубнеплодов, могут быть удалены путем диафильтрации, но могут быть заменены солью в солевом растворе.

В данном контексте диафильтрационная мембрана (ДФ мембрана) представляет собой мембрану, используемую при диафильтрации. Предпочтительная номинально задерживаемая молекулярная масса ДФ мембраны составляет от 3 до 500 кДа, предпочтительно от 5 до 300 кДа, более предпочтительно от 5 до 200 кДа, как например, предпочтительно от 30 до 200 кДа, более предпочтительно от 40 до 120 кДа, еще более
 25 предпочтительно от 50 до 100 кДа. Согласно одному варианту реализации номинально задерживаемая молекулярная масса может составлять 3–50 кДа, предпочтительно 5–25 кДа, как например 5–15 кДа или 15–25 кДа. Согласно другому варианту реализации номинально задерживаемая молекулярная масса может составлять 50–200 кДа, предпочтительно 50–150 кДа.

Предпочтительными ДФ мембранами являются мембраны из полисульфона (ПС), полиэфирсульфона (ПЭС), поливинилиденфторида (ПВДФ), полиакрилонитрила (ПАН), регенерированной целлюлозы и полипропилена (ПП), предпочтительно мембраны из ПЭС или ПС. Предпочтительными ДФ мембранами являются анизотропные ДФ

мембраны. ДФ мембрана может быть выполнена в виде трубки, спиральной намотки, полого волокна, пластины и рамки или в виде блоков поперечно-вращательного изменения сдвига. Наиболее предпочтительными ДФ мембранами являются трубчатые ДФ мембраны. Каждая из этих мембран может иметь номинально задерживаемую молекулярную массу в соответствии с определением в настоящей заявке.

Согласно предпочтительным вариантам реализации диафильтрацию выполняют как непрерывный (с поперечным потоком) процесс. Например, рабочий поток может составлять от 3 до 300 л·(ч·м²)⁻¹, предпочтительно от 5 до 200 л·(ч·м²)⁻¹, более предпочтительно от 5 до 100 л·(ч·м²)⁻¹, более предпочтительно от 6 до 70 л·(ч·м²)⁻¹, более предпочтительно от 6 до 30 л·(ч·м²)⁻¹, более предпочтительно от 7 до 30 л·(ч·м²)⁻¹, более предпочтительно от 9 до 20 л·(ч·м²)⁻¹.

Было обнаружено, что основные белковые фракции белка клубнеплодов, в частности белка картофеля, имеют противоположный заряд при многих значениях pH. Уровень pI пататина составляет 4,8–5,2, тогда как уровень pI ингибитора протеазы составляет 5,8–9. Даже значения pH, оптимизированные для растворимости, не могут предотвратить агрегацию, осаждение и засорение, в частности, при диафильтрации. Было обнаружено, что удельная проводимость раствора значительно влияет на растворимость белка, и что низкая растворимость может быть компенсирована увеличением удельной проводимости. Это особенно важно при диафильтрации.

Было обнаружено, что для любого раствора, содержащего нативный изолят белка, в соответствии с определением в настоящей заявке, важно, чтобы удельная проводимость оставалась относительно высокой в течение всего процесса выделения. Удельная проводимость солевого раствора, с использованием которого проводят диафильтрацию, должна составлять по меньшей мере 5 мСм·см⁻¹, а удельная проводимость исходного раствора должна составлять 2–20 мСм·см⁻¹.

При диафильтрации белок находится под сильным воздействием механических напряжений вблизи мембраны. Профиль потока при диафильтрации собирает различные белковые молекулы вместе, что приводит к принудительной агрегации и осаждению. Более того, белки могут взаимодействовать с мембраной. Таким образом, механические напряжения, под воздействием которых находится белок при диафильтрации, и любые взаимодействия с мембранами приводят к засорению мембраны, что затрудняет диафильтрацию белковых растворов в промышленных масштабах.

Было обнаружено, что солевой раствор, имеющий удельную проводимость по меньшей мере $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, стабилизирует белок, находящийся под действием механических напряжений, возникающих при диафильтрации, тем самым поддерживая и даже увеличивая растворимость белка при механических напряжениях. Это увеличивает стабильность потока, увеличивает продолжительность диафильтрации, а также сводит к минимуму потери белка. Следовательно, необходимо проводить диафильтрацию с использованием солевого раствора. Это важно для поддержания стабильности белка в растворе при диафильтрации. Применяемый в настоящей заявке термин «солевой раствор» определяется как раствор, содержащий соли, удельная проводимость которого составляет по меньшей мере $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Было обнаружено, что удельная проводимость солевого раствора должна составлять по меньшей мере $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно по меньшей мере $8 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, более предпочтительно по меньшей мере $15 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$ с целью сохранения высокой растворимости всего белка клубнеплодов при диафильтрации. Однако, чтобы избежать чрезмерного добавления соли при диафильтрации, удельная проводимость предпочтительно должна составлять менее $100 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, более предпочтительно менее $50 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, более предпочтительно менее $20 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, еще более предпочтительно менее $18 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Кроме того, важно, чтобы удельная проводимость диафильтруемого раствора (исходный раствор или исходная жидкость) составляла $2\text{--}20 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно $5\text{--}18 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, более предпочтительно $8\text{--}14 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Это является гарантией того, что белок не выпадет в осадок до проведения диафильтрации. Уровень pH диафильтруемого исходного раствора предпочтительно ниже 4,0 или выше 5,5, более предпочтительно $5,5\text{--}12$, еще более предпочтительно $5,5\text{--}7,0$.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации диафильтрацию проводят с использованием солевого раствора, имеющего удельную проводимость в соответствии с определением в настоящей заявке, предпочтительно $5\text{--}20 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно $5\text{--}18 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, более предпочтительно $8\text{--}15 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, еще более предпочтительно $9\text{--}14 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, как например $9\text{--}11$ или $10\text{--}13 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Солевой раствор предпочтительно содержит хлоридную соль, как например NaCl, KCl и/или CaCl_2 , предпочтительно NaCl или KCl. Солевой раствор предпочтительно может содержать KCl. В альтернативном варианте, солевой раствор предпочтительно

может содержать NaCl. Кроме того, в альтернативном варианте, солевой раствор включает смесь NaCl и KCl.

Предпочтительно соль представляет собой NaCl. В случае с NaCl концентрация соли в солевом растворе может составлять 0,1–5 масс.%, предпочтительно 0,2–2 масс.%.

5 Специалист в данной области может определить массовые концентрации (или молярности) при известных значениях удельной проводимости в присутствии или отсутствии других растворенных веществ на основе общих знаний. Например, удельная проводимость раствора NaCl с 0,33 масс.% составляет 5,3 мСм·см⁻¹.

10 Согласно наиболее предпочтительным вариантам реализации солевой раствор не содержит солей тяжелых металлов, как например соли кадмия, ртути, свинца или мышьяка. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации солевой раствор дополнительно содержит NH₄HCO₃, который увеличивает рабочий поток.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации уровень pH солевого раствора может составлять менее 4,0 или более 5,5, более предпочтительно 5,5–12, более предпочтительно 5,5–8,0, еще более предпочтительно 6,0–8,0, как например 5,5–7,0 или 6,0–7,0. Согласно предпочтительным вариантам реализации заданный уровень pH поддерживается на протяжении всего процесса диафильтрации. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации солевой раствор, применяемый для дополнительных стадий диафильтрации, имеет более высокий уровень pH, как например 20 8,0–12,0, предпочтительно 9,0–11,0, что дополнительно увеличивает рабочий поток через мембрану.

Диафильтрацию предпочтительно проводят при степени разбавления от 5:1 до 1:10, предпочтительно от 1:1 до 1:10 (исходная жидкость – солевой раствор), предпочтительно от 1:1 до 1:5, более предпочтительно от 1:1 до 1:4. Диафильтрационный ретентат может быть подвергнут второй, третьей или последующей стадии диафильтрации.

Данные условия приводят к получению диафильтрационного ретентата, содержащего чистый нативный белок клубнеплодов. Диафильтрационный ретентат содержит в процентах от сухого вещества по меньшей мере 75 масс.%, предпочтительно по меньшей мере 80 масс.%, более предпочтительно по меньшей мере 85 масс.%, еще более предпочтительно по меньшей мере 90 масс.% нативного белка клубнеплодов, предпочтительно по большей мере 1,0 масс.%, более предпочтительно по большей мере 0,5 масс.%, более предпочтительно по большей мере 0,1 масс.% от общего количества

глюкозы, фруктозы и сахарозы, предпочтительно по большей мере 1,0 масс.% свободных аминокислот клубнеплодов, более предпочтительно по большей мере 0,5 масс.%, более предпочтительно по большей мере 0,1 масс.% небелковых аминокислот клубнеплодов, предпочтительно по большей мере 10 мг/кг, более предпочтительно по большей мере 5 мг/кг сульфита, предпочтительно по большей мере 200 мг/кг, более предпочтительно по большей мере 100 мг/кг, более предпочтительно по большей мере 50 мг/кг, еще более предпочтительно по большей мере 25 мг/кг гликоалкалоидов, предпочтительно по большей мере 5 мг/кг тяжелых металлов, выбранных из группы, состоящей из кадмия, ртути, свинца и мышьяка, и/или предпочтительно по большей мере 10 масс.% хлоридных солей, более предпочтительно по большей мере 5 масс.%. Содержание золы составляет предпочтительно по меньшей мере 5 масс.%, более предпочтительно по меньшей мере 3 масс.%, более предпочтительно по меньшей мере 1 масс.%. Более того, желательно, чтобы содержание калия было ниже 4 масс.%, предпочтительно ниже 2 масс.%, более предпочтительно ниже 1 масс.%. Согласно наиболее предпочтительным вариантам реализации диафильтрационный ретентат соответствует всем указанным сочетаниям диапазонов параметров. Все количества выражены в процентах от сухого вещества.

Согласно предпочтительным вариантам реализации диафильтрацию проводят с использованием солевого раствора на всех стадиях. Согласно другому предпочтительному варианту реализации в частности, в случаях, когда солевой раствор применяют с относительно высокой удельной проводимостью в пределах указанных диапазонов, за диафильтрацией с использованием солевого раствора может следовать стадия диафильтрации с использованием воды при более низкой удельной проводимости или с использованием обычной воды, с целью удаления солей и выделения нативного белка клубнеплодов, по существу не содержащего соли.

Предпочтительно, удельную проводимость диафильтруемого раствора (исходный раствор или исходная жидкость) поддерживают в пределах указанных диапазонов. Согласно данному варианту реализации уровень pH предпочтительно остается неизменным на всех стадиях диафильтрации. Таким образом, засорение мембран может быть сбалансировано с необходимостью удаления соли после диафильтрации. Таким образом, можно получить изолят белка клубнеплодов с низким содержанием соли по отношению к сухому веществу.

В альтернативном варианте диафильтрационный ретентат необязательно может быть подвергнут стадии ультрафильтрации (УФ). Это приводит к концентрированию

диафильтрационного ретентата с одновременным удалением по меньшей мере части соли, которая была добавлена на стадии диафильтрации. Предпочтительно, чтобы удельная проводимость оставалась более или менее постоянной при ультрафильтрации. Таким образом, получают концентрированный изолят белка клубнеплодов с низким содержанием соли по отношению к сухому веществу. Предпочтительно концентрированный изолят белка клубнеплодов, полученный в результате ультрафильтрации, соответствует всем параметрам, описанным выше для диафильтрационного ретентата, но, кроме того, содержание соли в нем, выраженное в виде зольного остатка, составляет менее 5 масс.%, предпочтительно менее 3 масс.%, еще более предпочтительно менее 1 масс.%. Кроме того, предпочтительно, чтобы содержание калия составляло менее 4 масс.%, предпочтительно менее 2 масс.%, более предпочтительно менее 1 масс.%.

Ультрафильтрация может быть выполнена с помощью того же или другого оборудования, используемого при диафильтрации. Таким образом, номинально задерживаемая молекулярная масса мембраны может составлять от 3 до 500 кДа, предпочтительно от 5 до 300 кДа, более предпочтительно от 5 до 200 кДа, предпочтительно от 30 до 200 кДа, более предпочтительно от 40 до 120 кДа, еще более предпочтительно от 50 до 100 кДа. Согласно одному варианту реализации номинально задерживаемая молекулярная масса может составлять 3–50 кДа, предпочтительно 5–25 кДа, как например 5–15 кДа или 15–25 кДа, или 50–200 кДа, предпочтительно 50–150 кДа, независимо от мембраны, используемой при диафильтрации.

Предпочтительными УФ мембранами являются мембраны из полисульфона (ПС), полиэфирсульфона (ПЭС), поливинилиденфторида (ПВДФ), полиакрилонитрила (ПАН), регенерированной целлюлозы и полипропилена (ПП), предпочтительно мембраны из ПЭС или ПС, также независимо от мембраны, используемой при диафильтрации. Предпочтительными УФ мембранами являются анизотропные УФ мембраны. УФ мембрана может быть выполнена в виде трубки, спиральной намотки, полого волокна, пластины и рамки или в виде блоков поперечно-вращательного изменения сдвига. Наиболее предпочтительными УФ мембранами являются трубчатые УФ мембраны.

Рабочие потоки также могут быть такими же или отличными от рабочих потоков при диафильтрации, но обычно являются подобными рабочим потокам при диафильтрации, как описано выше. УФ предпочтительно проводят так, чтобы получить концентрированный изолят белка клубнеплодов, содержащий общее количество

растворенных твердых веществ в пределах 0,5–25° по Бриксу, предпочтительно 5–22° по Бриксу, более предпочтительно 10–18° по Бриксу, еще более предпочтительно 12–17° по Бриксу, еще более предпочтительно 14–16° по Бриксу. Согласно другим предпочтительных вариантам реализации общее количество растворенных твердых частиц может составлять до 30° по Бриксу, до 40° по Бриксу или до 50° по Бриксу.

Согласно предпочтительным вариантам реализации ультрафильтрацию выполняют с помощью того же оборудования, что и при проведении диафильтрации. Таким образом, мембраны, рабочие потоки и другие параметры способа, а также оборудование предпочтительно одинаковы. Это увеличивает рабочую эффективность способа.

Затем изолят нативного белка клубнеплодов может быть высушен с получением порошка нативного белка клубнеплодов. Высушивание можно проводить любыми способами, известными в данной области техники, предпочтительно путем высушивания распылением или высушивания вымораживанием. Необязательно, изолят нативного белка клубнеплодов подвергают дополнительной стадии концентрирования перед высушиванием, предпочтительно путем обратного осмоса, выпаривания или концентрирования вымораживанием. Способы, как этого добиться, описаны в других источниках и являются общеизвестными.

Наиболее предпочтительно, чтобы перед высушиванием уровень pH изолята белка клубнеплодов довели до 5,5–7,0, предпочтительно до 6,0–7,0. Это увеличивает стабильность порошка нативного белка клубнеплодов, что облегчает его хранение.

Кроме того, предпочтительно, чтобы уровень pH изолята белка клубнеплодов, в частности концентрированного водного изолята белка клубнеплодов, был доведен до значения выше 2,5, предпочтительно выше 2,75 с целью стабилизации вязкости белкового раствора и предотвращения загустения раствора за время его хранения перед высушиванием. Предпочтительно данные значения pH применимы для изолята белка клубнеплодов, содержащего ингибитор протеазы клубнеплодов.

Кроме того, уровень pH концентрированного изолята белка клубнеплодов может быть доведен до значения ниже 4,0, предпочтительно ниже 3,5, более предпочтительно ниже 3,0, также с целью стабилизации вязкости белкового раствора за время хранения перед высушиванием. Предпочтительно данные значения pH применимы для изолята белка клубнеплодов, содержащего пататин клубнеплодов.

С целью эффективной реализации данного способа диафильтрации важно использовать относительно чистый исходный раствор для диафильтрации, который содержит нативный белок клубнеплодов, в соответствии с определением в настоящей заявке. В данном контексте чистый исходный раствор для диафильтрации получают в соответствии со стадиями а) и б).

На стадии а) настоящего способа по меньшей мере один клубнеплод перерабатывают с получением водной жидкости, содержащей белок клубнеплодов. Данную жидкость можно назвать водой после переработки клубнеплодов. Такая переработка включает, например, перетирание, приготовление пюре, измельчение на терке, дробление, прессование или нарезание клубнеплодов и, необязательно, с добавлением воды, с получением указанной воды после переработки клубнеплодов, содержащей нативный белок клубнеплодов.

Водная жидкость может содержать крахмал, и предпочтительно ее подвергают стадии удаления крахмала, например, путем декантирования, циклонирования или фильтрации, как известно в данной области техники, для получения воды после переработки клубнеплодов, содержащей нативный белок клубнеплодов. Согласно данному варианту реализации вода после переработки клубнеплодов предпочтительно является побочным продуктом производства крахмала, например картофельным соком, полученным после выделения крахмала в картофельной промышленности.

Согласно другим вариантам реализации клубнеплоды можно перерабатывать путем нарезания с целью придания формы, которая является основой для продуктов из переработанных клубнеплодов, таких, как например, чипсы и картофель фри, предпочтительно из картофеля. Нарезание клубнеплодов в присутствии воды приводит к получению воды после переработки клубнеплодов, содержащей нативный белок клубнеплодов.

Согласно одному варианту реализации клубнеплод может быть переработан струйным потоком воды для нарезания клубнеплода. Согласно другому варианту реализации клубнеплод может быть переработан путем нарезания с помощью ножей, например, в присутствии воды. Жидкость, получаемая в результате таких процессов нарезания, содержит нативный белок клубнеплодов и является дополнительным предпочтительным типом воды после переработки клубнеплодов на стадии а).

На стадии б) воду после переработки клубнеплодов подвергают по меньшей мере одной стадии предварительной обработки, как например концентрирование,

разбавление, регулирование уровня pH, флокуляция, удаление твердых частиц и/или термическая обработка, в результате чего получают предварительно обработанную воду после переработки клубнеплодов, содержащую нативный белок. Эти стадии можно выполнять в любом порядке. Удаление твердых частиц относится к способам удаления 5 мелких нерастворимых частиц из раствора. Такие нерастворимые частицы включают (агрегаты) липидов, нерастворимых белков, остаточных фрагментов клеточных стенок, небольших зерен крахмала или их фрагментов, микроорганизмов и частиц почвы. Предварительная обработка важна для того, чтобы вода после переработки клубнеплодов могла быть эффективно обработана с минимальным разложением или денатурацией белка 10 или вообще без них, а также для предотвращения засорения фильтров и мембран, образования пленки и накипи на поверхностях технологического оборудования и для обеспечения высокой стабильности и эффективности способа.

Концентрирование воды после переработки клубнеплодов может быть проведено любым способом, известным в данной области техники, с целью удаления 15 избытка воды. Предпочтительными способами являются способы, пригодные для работы при относительно низкой температуре, как например 40°C или ниже, предпочтительно 35°C или ниже, более предпочтительно 30°C или ниже, еще более предпочтительно 25°C или ниже. Более того, предпочтительно, что предварительная обработка путем концентрирования может происходить при высокой скорости процесса. 20 Предпочтительными способами концентрирования воды после переработки клубнеплодов являются ультрафильтрация, обратный осмос и концентрирование вымораживанием, предпочтительно ультрафильтрация. Данные способы известны в данной области техники.

Согласно одному варианту реализации концентрирование проводят путем концентрирования вымораживанием. Концентрирование вымораживанием можно 25 проводить способом, описанным в WO 2017/146568, или другими способами, известными в данной области техники.

Согласно другому варианту реализации концентрирование проводят путем обратного осмоса. Обратный осмос может быть выполнен с помощью мембран обратного осмоса, которые не имеют видимых пор, как известно в данной области техники. 30 Мембраны обратного осмоса разделяют растворенные вещества на основе различной растворимости растворенных веществ в материале мембраны, как известно в данной области техники. Рабочие потоки при проведении обратного осмоса, как правило, аналогичны рабочим потокам при проведении диафильтрации (или ультрафильтрации),

как например, $2\text{--}50 \text{ л}\cdot(\text{ч}\cdot\text{м}^2)^{-1}$, предпочтительно $5\text{--}30 \text{ л}\cdot(\text{ч}\cdot\text{м}^2)^{-1}$, более предпочтительно $10\text{--}25 \text{ л}\cdot(\text{ч}\cdot\text{м}^2)^{-1}$.

Согласно другому, наиболее предпочтительному варианту реализации концентрирование проводят путем ультрафильтрации. Преимущество ультрафильтрации в том, что она может быть осуществима при высоком рабочем потоке, в то же время будучи экономичной. Рабочий поток может составлять, например, от 3 до $150 \text{ л}\cdot(\text{ч}\cdot\text{м}^2)^{-1}$, предпочтительно от 5 до $50 \text{ л}\cdot(\text{ч}\cdot\text{м}^2)^{-1}$, предпочтительно от 7 до $30 \text{ л}\cdot(\text{ч}\cdot\text{м}^2)^{-1}$, еще более предпочтительно от 9 до $20 \text{ л}\cdot(\text{ч}\cdot\text{м}^2)^{-1}$. Согласно предпочтительным вариантам реализации ультрафильтрацию выполняют как непрерывный (с поперечным потоком) процесс.

Предпочтительными мембранами для использования при предварительной обработке путем ультрафильтрации являются мембраны из полисульфона (ПС), полиэфирсульфона (ПЭС), поливинилиденфторида (ПВДФ), полиакрилонитрила (ПАН), регенерированной целлюлозы и полипропилена (ПП), предпочтительно мембраны из ПЭС и ПС. Предпочтительно, номинально задерживаемая молекулярная масса мембран составляет $3\text{--}500 \text{ кДа}$, предпочтительно, $5\text{--}300 \text{ кДа}$.

При ультрафильтрации воды после переработки клубнеплодов, содержащей относительно небольшое количество взвешенных твердых частиц (например, сок, содержащий небольшое количество клеточного мусора и/или уже прошедший стадию удаления твердых частиц), номинально задерживаемая молекулярная масса мембран составляет предпочтительно $3\text{--}100 \text{ кДа}$, как например $5\text{--}50 \text{ кДа}$, более предпочтительно $5\text{--}20 \text{ кДа}$.

При ультрафильтрации воды после переработки клубнеплодов, содержащей относительно большое количество взвешенных твердых частиц (например, сок, содержащий большое количество клеточного мусора и еще не прошедший стадию удаления твердых частиц), номинально задерживаемая молекулярная масса мембран составляет предпочтительно $20\text{--}300 \text{ кДа}$, более предпочтительно $50\text{--}150 \text{ кДа}$.

Дополнительные условия процесса предварительной обработки путем ультрафильтрации могут быть такими же, как определено выше для случая диафильтрации. Согласно предпочтительным вариантам реализации предварительную обработку путем ультрафильтрации проводят с помощью того же оборудования, что и при проведении диафильтрации. То есть, любую стадию ультрафильтрации предпочтительно проводить с помощью мембраны, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет $5\text{--}300 \text{ кДа}$, предпочтительно $30\text{--}200 \text{ кДа}$, более предпочтительно 40--

120 кДа, еще более предпочтительно 50–100 кДа. «Любая стадия ультрафильтрации» означает, что, если стадия ультрафильтрации присутствует, то ультрафильтрация предпочтительно должна быть выполнена с помощью указанных типов мембран. Альтернативная формулировка может заключаться в том, что ультрафильтрация, если
5 таковая имеется, должна быть выполнена с помощью указанных типов мембран.

Разбавление воды после переработки клубнеплодов может быть выполнено любым способом, известным в данной области техники. Таким образом, вода после переработки клубнеплодов может быть разбавлена (водопроводной или деминерализованной) водой, буфером или раствором кислоты либо основания. Согласно
10 некоторым вариантам реализации разбавление может быть выполнено путем диализа в качестве стадии предварительной обработки согласно методологии, а также с помощью оборудования, как упомянуто выше.

Предварительная обработка может включать один или несколько этапов регулирования уровня pH. Регулирование уровня pH может быть выполнено путем
15 добавления подходящей кислоты или основания, как известно в данной области техники. Подходящая кислота может представлять собой, например, соляную кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, муравьиную кислоту, фосфорную кислоту, серную кислоту и молочную кислоту; подходящее основание может представлять собой, например, гидроксид натрия или калия, хлорид аммония, карбонат натрия или калия, оксиды и
20 гидроксиды кальция и магния.

Регулирование уровня pH может быть выполнено с различными целями. Регулирование уровня pH может быть выполнено с целью изменения удельной проводимости раствора, а также изменения растворимости белка. В данном контексте регулирование уровня pH не должно приводить к полной денатурации белка, как
25 например, при кислотной коагуляции белка. Однако регулирование уровня pH воды после переработки клубнеплодов может привести к частичному осаждению белка или осаждению других компонентов воды после переработки клубнеплодов, которые впоследствии могут быть удалены на стадии удаления твердых частиц.

Например, доведение уровня pH до 4,0–5,5 может быть выполнено с целью
30 осаждения по меньшей мере части фракции пататина, в частности, при высокой концентрации, как например, при концентрации белка 5–20 масс.% в воде после переработки клубнеплодов, с получением воды после переработки клубнеплодов, содержащей более высокое относительное количество нативного ингибитора протеазы.

Осажденный белок может быть впоследствии удален на стадии удаления твердых частиц, согласно определению в других источниках. Это увеличивает относительное количество нативного ингибитора протеазы в изоляте нативного белка клубнеплодов.

Флокуляция может быть выполнена путем добавления подходящего флокулянта, как например, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, катионный или анионный полиакриламид, хитозан или каррагинан, как известно в данной области техники. Также можно использовать способы, описанные, например, в WO2016/036243. После флокуляции предпочтительно выполняют стадию удаления твердых частиц, как например декантирование, фильтрация, центрифугирование, циклонирование или микрофильтрация.

Термическая обработка также может быть выполнена в качестве предварительной обработки при условии, что термическая обработка не приводит к полной коагуляции белка. Например, путем термической обработки при 40–55°C в течение 1–120 минут можно удалить значительную часть пататина, который впоследствии может быть удален на стадии удаления твердых частиц. Также известно, что ингибитор протеазы клубнеплодов имеет более высокую термостойкость, чем пататин, и что нагревание может привести к частичной или полной денатурации пататина. Таким образом, этап термической обработки может быть выполнен в сочетании с этапом удаления твердых частиц, например, с получением воды после переработки клубнеплодов, обогащенной нативным ингибитором протеазы. Например, термическая обработка при 60–80°C, предпочтительно при 70–73°C, может быть выполнена с целью осаждения по меньшей мере части фракции пататина; затем может следовать стадия удаления твердых частиц с целью выделения нативного белка клубнеплодов, обогащенного нативным ингибитором протеазы.

В данном контексте удаление твердых частиц может быть выполнено в дополнение к другой стадии предварительной обработки, как описано выше, и предпочтительно после нее, но также может быть выполнено как единственная стадия предварительной обработки. Удаление твердых частиц, в соответствии с определением в настоящей заявке, также может быть выполнено при любой стадии настоящего способа. Однако предпочтительно удаление твердых частиц выполняют во время предварительной обработки. Предварительная обработка предпочтительно включает стадию удаления твердых частиц.

В данном контексте удаление твердых частиц предпочтительно представляет собой стадию фильтрации, центрифугирования, циклонирования, декантации,

нанофильтрации или микрофильтрации, наиболее предпочтительно микрофильтрации. Эти этапы можно выполнять, как известно в данной области техники.

Микрофильтрация (МФ) является наиболее предпочтительным способом предварительной обработки в любом из представленных вариантов реализации но, в частности, в вариантах реализации где удаление твердых частиц является единственной стадией предварительной обработки. Микрофильтрация может быть выполнена с целью отделения мелких частиц от жидкости. Микрофильтрацию можно проводить с помощью различных мембран, изготовленных из полисульфона (ПС), поливинилиденфторида (ПВДФ), полиакрилонитрила (ПАН) и полипропилена (ПП), а также с помощью керамических мембран, изготовленных из оксидов циркония, титана или алюминия. Микрофильтрацию предпочтительно выполняют с помощью мембран, имеющих размер пор 0,1–10 мкм, предпочтительно 0,2–4 мкм, более предпочтительно 0,3–1,5 мкм.

Микрофильтрация может быть выполнена как при постоянном давлении, так и при постоянном рабочем потоке. Давление может варьироваться от $1,5 \cdot 10^5$ до $5 \cdot 10^5$ Па. Рабочий поток может варьироваться от 0 до $350 \text{ л} \cdot (\text{ч} \cdot \text{м}^2)^{-1}$, предпочтительно от 45 до $350 \text{ л} \cdot (\text{ч} \cdot \text{м}^2)^{-1}$. Микрофильтрация воды после переработки клубнеплодов приводит к тому, что оптическая плотность воды после переработки клубнеплодов при 620 нм, предпочтительно становится ниже 0,2, более предпочтительно ниже 0,1 по сравнению с контрольным образцом деминерализованной воды.

Согласно наиболее предпочтительным вариантам реализации предварительная обработка включает стадию микрофильтрации. Согласно другим наиболее предпочтительным вариантам реализации предварительная обработка включает стадию ультрафильтрации. Согласно наиболее предпочтительному варианту реализации предварительная обработка включает только микрофильтрацию или состоит из нее. Согласно еще одному наиболее предпочтительному варианту реализации предварительная обработка включает или состоит из ультрафильтрации и последующей микрофильтрации или микрофильтрации и последующей ультрафильтрации.

В результате предварительной обработки получают относительно чистую воду после переработки клубнеплодов, которая является исходным раствором при выполнении диафильтрации. Предварительная обработка предпочтительно приводит к получению исходного раствора для диафильтрации, который имеет оптическую плотность при 620 нм ниже 0,2, более предпочтительно ниже 0,1 по сравнению с контрольным образцом деминерализованной воды. Кроме того, предварительная обработка предпочтительно

приводит к получению исходного раствора для диафильтрации, который имеет удельную проводимость и pH, согласно определению в настоящей заявке. Общее количество растворенных твердых частиц в исходном растворе для диафильтрации предпочтительно составляет 2–10° по Бриксу, более предпочтительно 3–8° по Бриксу, например 4–6° по Бриксу. Общее количество взвешенных твердых частиц составляет менее 0,05 об.%, предпочтительно менее 0,25 об.%, более предпочтительно менее 0,01 об.%. Наиболее предпочтительно, чтобы взвешенные твердые частицы практически отсутствовали. В этом отношении общее количество взвешенных твердых частиц измеряется центрифугированием образца и определением объемной доли осадка относительно надосадочной жидкости после центрифугирования.

Согласно другим наиболее предпочтительным вариантам реализации способ включает стадию удаления гликоалкалоидов с получением изолята белка клубнеплодов, содержащего не более 200 мг/кг гликоалкалоидов. В данном контексте гликоалкалоиды представляют собой гликозилированные алкалоиды, определяемые как совокупность производных соланина и чаконина. Данное количество также может быть названо общим содержанием гликоалкалоидов и может быть определено в соответствии с методом Laus *et al.*, (Laus M.C., Klip G. & Giuseppin M.L.F. (2016) Food Anal. Methods 10(4) “Improved Extraction and Sample Cleanup of Tri-glycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine in Non-denatured Potato Protein Isolates”). Как известно, гликоалкалоиды ядовиты для человека, поэтому их присутствие в изоляте белка клубней должно быть ограничено.

Способы удаления гликоалкалоидов в основном известны и могут быть представлены адсорбцией активированным углем, гидрофобными смолами или различными типами глины, хроматографией, кислотной экстракцией, ферментативным превращением или ферментацией. Примерные способы описаны в WO 2008/056977 и WO 2008/069651. Предпочтительно, удаление гликоалкалоидов выполняют путем адсорбции, например, пропусканием технологического потока, содержащего гликоалкалоиды, через колонку, содержащую подходящий адсорбент, как например активированный уголь, гидрофобные смолы или различные типы глины. Данный этап может быть выполнен в любой момент настоящего способа, но предпочтительно его выполняют как часть стадии предварительной обработки б) или после стадии в).

В других предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения способ включает начальный этап, когда по меньшей мере один клубнеплод очищают от кожуры перед обработкой. Соответственно способ предусматривает обработку

очищенных клубнеплодов. Преимущество заключается в том, что получаемая вода после переработки клубнеплодов значительно более чистая и, следовательно, требует меньшей предварительной обработки перед стадией диафильтрации настоящего способа. Кроме того, очистка клубнеплодов приводит к изменению белкового состава, так что

5 полученный нативный белок клубнеплодов обогащен аминокислотами аспарагиновой кислотой и аспарагином, глутаминовой кислотой и глутамином, тирозином, пролином и аргинином.

В наиболее предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения первичная диафильтрация или ультрафильтрации обеспечивает пермеат, содержащий

10 свободные аминокислоты клубнеплода. Таким образом, пермеат, полученный после проведения первичной диафильтрации или ультрафильтрации не утилизируют в качестве отходов, а отдельно перерабатывают с целью получения свободных аминокислот клубнеплода. Такая переработка предпочтительно включает стадию высушивания, предпочтительно путем высушивания распылением и/или высушивания вымораживанием,

15 с получением порошка свободных аминокислот клубнеплода. Высушиванию может предшествовать стадия концентрирования, как например ультрафильтрация, обратный осмос и/или концентрирование вымораживанием, как описано в других источниках.

Настоящий способ предпочтительно применяют в промышленном масштабе. Таким образом, настоящий способ предпочтительно применяют с целью получения по

20 меньшей мере 5 кг белка в час, более предпочтительно по меньшей мере 25 кг белка в час, еще более предпочтительно по меньшей мере 50 кг белка в час, потенциально до нескольких тонн в час. В предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения данный способ могут осуществлять со скоростью, например, 10–750 м³/час, предпочтительно 50–450 м³/час, более предпочтительно 80–300 м³/час. Таким образом,

25 предпочтительно, чтобы данный способ представлял собой способ, в котором все стадии выполняются непрерывно (в отличие от периодического действия), как например, в “конфигурации с непрерывной подачей и отводом”, как известно специалистам в данной области техники.

Согласно вариантам реализации если вода после переработки клубнеплодов

30 имеет высокую концентрацию белка, например более 1 масс.%, предпочтительно более 1,5 масс.%, способ переработки воды после переработки клубнеплодов предпочтительно включает предварительную микрофильтрацию с последующей диафильтрацией, как описано выше. Предпочтительно данный способ, помимо всего прочего, включает стадию

флоккуляции, которую выполняют либо до, либо после стадии микрофильтрации. Согласно другим предпочтительным вариантам реализации воду после переработки клубнеплодов, помимо всего прочего, подвергают стадии ультрафильтрации перед стадией диафильтрации. В данном варианте реализации настоящего изобретения способ

5 включает первичную ультрафильтрацию, за которой следует стадия диафильтрации. В дополнительных вариантах реализации настоящего изобретения диафильтрационный ретентат может быть сконцентрирован путем ультрафильтрации, выполненной перед высушиванием. Первичная и вторичная ультрафильтрация могут быть выполнены при тех же общих условиях способа, как описано выше, но необязательно, чтобы этапы способа

10 были идентичными.

Оптимизированный способ выделения нативного белка клубнеплодов из воды после переработки клубнеплодов, содержащей высокую концентрацию белка, включает или состоит из этапов в указанном порядке: микрофильтрация, флоккуляция и диафильтрация, или флоккуляция, микрофильтрация и диафильтрация, или флоккуляция,

15 микрофильтрация, ультрафильтрация и диафильтрация или микрофильтрация, ультрафильтрация и диафильтрация. В наиболее предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения данная последовательность состоит из этапов микрофильтрации, ультрафильтрации и диафильтрации. В альтернативном варианте последовательность стадий включает или состоит из этапов флоккуляции, микрофильтрации,

20 ультрафильтрации, диафильтрации или стадий флоккуляции, ультрафильтрации и диафильтрации, за каждой из которых необязательно может следовать этап ультрафильтрации.

Все перечисленные стадии могут быть выполнены в соответствии с параметрами, описанными в настоящей заявке. Согласно вариантам реализации за этапом

25 флоккуляции предпочтительно следует этап удаления твердых частиц, предпочтительно центрифугирование. Все варианты реализации настоящего изобретения предпочтительно дополняют стадией удаления гликоалкалоидов на любом этапе способа. Каждый из этих способов может включать стадию высушивания, которой необязательно предшествует стадия концентрирования, предпочтительно ультрафильтрации.

30 Согласно вариантам реализации если вода после переработки клубнеплодов имеет низкую концентрацию белка, например менее 1,5, предпочтительно менее 1 масс.%, способ предварительной обработки воды после переработки клубнеплодов предпочтительно включает стадию ультрафильтрации с последующей диафильтрацией,

как описано выше. Предпочтительно, данной последовательности стадий предшествует стадия микрофльтрации. Более того, предпочтительно, чтобы диафилтратационный ретентат затем подвергали ультрафилтратции. Оптимизированный способ выделения нативного белка клубнеплодов из воды после переработки клубнеплодов, содержащей

5 низкую концентрацию белка, состоит из следующих этапов: микрофилтратция, ультрафилтратция, диафилтратция и, необязательно, ультрафилтратция и/или высушивание, в соответствии с определением в настоящей заявке, с добавлением этапа удаления гликоалкалоидов в любой момент процесса.

Необязательно, диафилтратационный ретентат или концентрированный раствор,

10 полученный путем ультрафилтратции диафилтратационного ретентата, может быть подвергнут стадии фракционирования, как например адсорбции или хроматографии. Данные способы разделения нативного белка клубнеплодов на фракцию ингибитора протеазы, фракцию пататина или фракцию общего белка известны. Таким образом, данные способы могут применяться с целью дальнейшей очистки общего изолята белка

15 клубнеплодов или с целью получения изолята ингибитора протеазы или изолята пататина.

Однако в предпочтительных вариантах реализации настоящего изобретения выделение белка проводят без включения стадии абсорбции белка. Способ предпочтительно не включает стадию абсорбции белка абсорбентом, при которой белок адсорбируется на адсорбенте с высоким сродством (определяемый как белок, имеющий

20 более высокое сродство к адсорбенту, в отличие от других компонентов обрабатываемой жидкости). Способ предпочтительно не включает процесс абсорбции-элюции белка или хроматографии белка, как например, адсорбция в кипящем слое, мембранная адсорбция или стадия хроматографии.

Кроме того, способ предпочтительно также не включает стадию

25 денатурирования. В наиболее предпочтительных вариантах реализации настоящего способа следят за тем, чтобы температура воды после переработки клубнеплодов оставалась ниже 40°C во время предварительной обработки, диафилтратции и любой другой стадии перед высушиванием. Это помогает достичь стабильности вязкости белкового раствора во времени, а также позволяет избежать денатурации белка. Кроме

30 того, настоящий способ предпочтительно не включает дополнительных стадий денатурирования или стадии с большим усилием сдвига, как например, дробление на микрочастицы.

Выделение белка согласно настоящему способу

Настоящий способ имеет несколько преимуществ по сравнению с известными способами выделения изолята нативного белка клубнеплодов. На выходе получают белок более чистый, менее разрушенный, менее денатурированный (более нативный) с
5 улучшенными функциональными свойствами. Кроме того, белок не имеет постороннего привкуса и не вызывает неприятного ощущения во рту.

Белок, выделенный в соответствии с настоящим способом, представляет собой чистый нативный белок с высоким содержанием белка. Он содержит в процентах от сухого вещества по меньшей мере 75 масс.% нативного белка клубнеплодов,
10 предпочтительно по меньшей мере 80 масс.% нативного белка клубнеплодов, более предпочтительно по меньшей мере 85 масс.% нативного белка клубнеплодов, еще более предпочтительно по меньшей мере 90 масс.% нативного белка клубнеплодов.

Способность выделенного белкового порошка растворяться в деминерализованной воде является мерой степени денатурации; денатурированный
15 белковый порошок нерастворим в воде, тогда как нативный белковый порошок растворим в воде. Нативный белок клубнеплодов, выделенный с помощью настоящего способа (и впоследствии высушенный), может быть растворен в деминерализованной воде практически полностью. Это означает, что можно повторно растворить в деминерализованной воде по меньшей мере 55% выделенного белка, предпочтительно по
20 меньшей мере 65% белка, более предпочтительно по меньшей мере 75% белка, еще более предпочтительно по меньшей мере 85% белка или даже по меньшей мере 90% белка.

Функциональные свойства, включая растворимость, сравнимы со свойствами белка, который встречается в природе (внутри клубнеплода). Кроме того, выделение белка настоящим способом не влияет на эмульгирующие свойства.

Кроме того, белок содержит по большей мере 1,0 масс.% общего количества глюкозы, фруктозы и сахарозы, по большей мере 1 масс.% небелковых аминокислот клубнеплодов, по большей мере 10 мг/кг, предпочтительно по большей мере 5 мг/кг
25 сульфита, по большей мере 200 мг/кг, предпочтительно по большей мере 100 мг/кг, более предпочтительно по большей мере 50 мг/кг, еще более предпочтительно по большей мере 25 мг/кг гликоалкалоидов, по большей мере 5 мг/кг тяжелых металлов, выбранных из группы, состоящей из кадмия, ртути, свинца и мышьяка и по большей мере 10 масс.%
30 хлоридных солей, предпочтительно по большей мере 5 масс.%. Предпочтительно

содержание золы составляет менее 5 масс.%, предпочтительно менее 3 масс.%, более предпочтительно менее 1 масс.%.

Низкое содержание сахара и низкое содержание свободных аминокислот важны, потому что сахара, такие как глюкоза, фруктоза и сахароза, являются
5 восстанавливающими сахарами, которые в реакции с свободными аминокислотами могут образовывать пиразины, являющиеся причиной неприятного вкуса.

Предпочтительно содержание сахара составляет менее 1,0 масс.%,
предпочтительно менее 0,5 масс.%, более предпочтительно менее 0,1 масс.%, более
предпочтительно менее 0,05 масс.% по отношению к сухой массе композиции. Кроме
10 того, предпочтительно, изолят содержит по большей мере 1 масс.% свободных аминокислот клубнеплодов, более предпочтительно по большей мере 0,5 масс.% свободных аминокислот клубнеплодов, еще более предпочтительно по большей мере 0,1 масс.% свободных аминокислот клубнеплодов, еще более предпочтительно по большей мере 0,05 масс.% свободных аминокислот клубнеплодов по отношению к сухой массе
15 композиции.

Настоящий способ выгодно снижает количество как сахаров, так и свободных аминокислот клубнеплодов. Кроме того, диафильтрация, проводимая с использованием солевого раствора, обеспечивает условия, при которых белок стабилизируется и, таким образом, не разлагается или почти не разлагается под действием принудительного
20 механического воздействия при диафильтрации. Это сводит к минимуму образование дополнительных свободных аминокислот.

Кроме того, настоящий способ сводит к минимуму присутствие сульфита в полученном изоляте белка клубнеплодов. Сульфит дестабилизирует белковые растворы, однако обычно его добавляют в воду после переработки клубнеплодов при обработке
25 крахмала с целью предотвратить окисление и, следовательно, окрашивание воды после переработки клубнеплодов. Настоящий способ эффективно удаляет сульфиты, что приводит к повышенной стабильности вязкости.

В предпочтительных вариантах реализации способ включает стадию удаления солей из изолята белка клубнеплодов, в частности солей клубнеплодов, и/или солей,
30 которые были добавлены на стадии диафильтрации. Это может быть достигнуто, согласно способам, описанным выше, в результате чего образуется белок с низким содержанием золы, низким содержанием калия, а также с низким содержанием тяжелых металлов.

В целях ясности и краткого описания признаки описаны в данной заявке как часть тех же или отдельных вариантов реализации, однако следует понимать, что объем изобретения может включать варианты реализации, имеющие комбинации всех или некоторых описанных признаков. Ниже приведены иллюстративные примеры, которые никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

Гликоалкалоиды (общие гликоалкалоиды) определяют в основном в соответствии со способом, указанным Лаусом и др. (Laus M.C., Klip G. & Giuseppin M.L.F. (2016) Food Anal. Methods 10(4) “Improved Extraction and Sample Cleanup of Triglycoalkaloids α -Solanine and α -Chaconine in Non-denatured Potato Protein Isolates”).

Образцы растворяют или разбавляют в 5% растворе уксусной кислоты, содержащем 20 мМ натриевой соли гептансульфоновой кислоты (VWR 152783K), в течение по меньшей мере 2 часов. Нерастворимые вещества удаляют центрифугированием при 9000 g при температуре окружающей среды (Heraeus Multifuge 1 SR, ротор 75002006), и надосадочную жидкость фильтруют через шприцевой фильтр GHP Acrodisc 13 мм с мембраной GHP 0,45 мкм непосредственно в вials для ВЭЖХ объемом 1,5 мл (VWR 548- 0004) и закрывают алюминиевой крышкой с обжимным краем 11 мм, с септой резина/бутил/TEF (VWR 548-0010). Образцы автоматически вводят в колонку для твердофазной экстракции (Oasis HLB prospect-2/картридж Symbiosis 2,0 x 10 мм, размер частиц 30 мкм) через систему твердофазной экстракции Robotlon (Separations). Гликоалкалоиды элюируют с помощью колонки Hypersil ODS C18 (250 мм x 4,6 мм; 5 мкм) и разделяют с добавлением 50% ацетонитрил/фосфатного буфера с pH = 7,6. Аналиты выявляют с помощью УФ детектора Smartline 2520 (Knauer) и определяют их количество из калибровочной кривой, построенной для очищенных гликоалкалоидов (α -соланин, Carl Roth 4192,1 и α -чаконин Carl Roth 2826,1).

Металлы выявляют методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой в соответствии с ISO 17294-2:2016.

Элементный состав определяют с помощью рентгеновской флуоресценции для всех элементов с атомным номером выше, чем у натрия, с помощью спектрометра Rigaku CG ED-XRF (Rigaku).

Зольность определяют путем сжигания образца при 550°C и взвешивания остатка.

Содержание сахара определяют с помощью набора Megazyme SuFrG в соответствии с инструкциями производителя.

Количество общих взвешенных твердых частиц может быть определено путем определения оптической плотности клубнеплодного сока с содержанием сухого вещества
5 4,5 масс.% при длине волны 620 нм.

Количество растворенных твердых частиц может быть определено путем измерения на портативном цифровом рефрактометре PAL alpha (AT 3840, Atago).

Оптическую плотность при 620 нм определяют путем разбавления раствора до 5,0° по Бриксу (соответствует 4,5 масс.% сухого вещества) и центрифугирования при
10 14000 об./мин на центрифуге Eppendorf в течение 10 минут с целью удаления нерастворимых веществ. Растворы со значениями Брикса ниже 5 центрифугировали как есть. Аликвоты по 1 мл надосадочной жидкости каждого раствора наливают в кювету и помещают в спектрофотометр BioRad SmartSpec Plus. Оптическую плотность измеряют дважды при 620 нм относительно контрольного образца с деминерализованной водой.

15 Удельная проводимость может быть определена с помощью кондуктометра HI 98312 (Hanna Nindustries, Нидерланды) при комнатной температуре, что хорошо известно в данной области техники. Удельная проводимость также может быть определена расчетным способом, где это необходимо, на основе различных концентраций растворенных веществ, как известно в данной области техники.

20 Концентрация белка может быть определена по методу Кьельдали. Затем азотное число преобразуется в содержание белка путем умножения на 6,25.

Содержание чистого белка определяют с помощью экспресс-анализатора белка Sprint (CEM). Данный способ основан на взаимодействии отрицательно заряженного красителя (iTAG) с положительно заряженными аминокислотами (лизин, аргинин и
25 гистидин), присутствующими в белке в кислой среде. Гидрофобная природа красителя вызывает осаждение белков, а потеря адсорбции красителя при 480 нм переводится в содержание белка с помощью калибровочной кривой, построенной на основе анализа Кьельдали, который был проведен на тщательно очищенных белковых препаратах. Азотистые соединения, такие как отдельные аминокислоты и низкомолекулярные
30 пептиды, не осаждаются в растворе красителя и, как следствие, не влияют на измерение содержания белка.

Влажность обозначается как потеря массы при высушивании и определяется путем помещения алюминиевого поддона с образцом (VWR 611-9000), содержащего от 1

до 10 граммов образца, в галогенную сушилку HG83 (Mettler Toledo) при температуре 100°C в течение 10 минут.

В экспериментах при диафильтрации часто используют следующие солевые растворы: 0,5 масс.% NaCl (удельная проводимость 8,2 мСм·см⁻¹); 0,5 масс.% KCl (удельная проводимость 8,2 мСм·см⁻¹); 0,33 масс.% NaCl (удельная проводимость 5,3 мСм·см⁻¹).

Определение белкового состава с помощью системы Experion

Белковый состав определяют с помощью автоматической системы электрофореза Experion Pro260 (Bio-Rad, США). Сначала температуру реагентов доводят до комнатной и в течение непродолжительного времени встряхивают, после чего реагенты центрифугируют на центрифуге при 10000 x g в течение 5 минут. Затем готовят растворы геля и гель-красителя, первый из которых не требует смешивания реагентов, а второй готовят путем смешивания 20 мкл красящего реагента с 520 мкл гелевого реагента. Затем оба раствора встряхивают и центрифугируют при 10000 x g в течение 5 минут в центрифуге Eppendorf, оснащенной фильтром 0,2 мкм. Далее готовят буфер для образца путем смешивания 30 мкл буфера для образца с 1 мкл β-меркаптоэтанола. Затем образцы и маркер готовят путем смешивания 4 мкл образца/маркера с 2 мкл буфера для образцов с последующим встряхиванием и центрифугированием при 10000 x g в течение 5 минут. Затем образец и маркер разбавляют 84 мкл сверхчистой воды. Чип Experion заполняется 12 мкл раствора гель-красителя на станции заправки, с выполнением программы В3. Затем 12 мкл гель-красителя и гелевого раствора закачивают в соответствующие лунки для чипа. 6 мкл маркера закачивают в углубление на чипе Experion. Затем по 6 мкл каждого образца загружают в лунки для образцов 1-10. Наконец, анализ начинается с загрузки экспериментального чипа в Experion Pro260 и запуска анализа Protein 260. После проведения анализа электроды очищают с помощью чистящего чипа.

Пример 1

Влияние концентрации соли на способность белка к агрегированию и осаждению оценивают с помощью модельных растворов при различных значениях pH и удельной проводимости. Модельный раствор содержит очищенный ингибитор протеазы и очищенный пататин (полученный путем хроматографии и подвергнутый интенсивному диализу).

Белок растворяют до общей концентрации белка 1 масс.% в соотношении 1:1 по массе очищенного ингибитора протеазы и очищенного пататина в 30 мМ цитратном буфере калия. При необходимости pH регулируют путем добавления HCl (1 М) или NaOH (1 М). Удельную проводимость устанавливают на значении 2, 12 или 50 мСм·см⁻¹ путем добавления хлорида калия. Образцы выдерживают при температуре окружающей среды в течение 1 часа и центрифугируют в течение 10 минут со скоростью 14000 об./мин на центрифуге Eppendorf с целью удаления осажженного белка. Надосадочную жидкость разбавляют в 25 раз путем добавления 100 мМ раствора NaOH. Концентрацию белка измеряют при 280 нм на спектрофотометре BioRad Smartspec Plus относительно 100 мМ бланка NaOH и выражают в процентах растворимого белка. Результаты показывают сильную зависимость растворимости картофельного белка от pH при низкой удельной проводимости, в то время как при более высокой удельной проводимости уровень pH уменьшается или становится равным нулю (см. ФИГ. 1).

15 **Пример 2**

Влияние концентрации соли на способность белка к агрегированию и осаждению под действием механических напряжений оценивают с помощью модельных растворов при различных значениях уровня pH и удельной проводимости. Модельный раствор содержит очищенный ингибитор протеазы и очищенный пататин (полученный хроматографией и подвергнутый интенсивному диализу) в молярном соотношении 1:1.

Белок растворяют при концентрации общего белка 2 и 6 масс.% в 10 мМ цитратном буфере. Буфер разбавляют раствором NaOH или HCl с целью доведения уровня pH до 6,0 или 7,0. К полученному раствору добавляют твердый KCl, чтобы установить удельную проводимость 2, 5, 12 и 50 мСм·см⁻¹. Растворы центрифугируют в течение 5 минут при 10,000 x g с целью удаления нерастворимого белка, а затем устанавливают конечную концентрацию белка (калиброванную по фракции белкового изолята) 1,5 и 4 масс.%. Растворимость белка определяют для каждой фракции отдельно и затем усредняют с целью отразить естественную изменчивость картофельного сока.

Полученный белковый раствор выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре, интенсивно перемешивая с помощью механической мешалки с целью имитации механических напряжений, возникающих при диафильтрации. Затем смесь белков центрифугируют в течение 5 минут при 10,000 x g и определяют концентрацию белка в надосадочной жидкости. Потери белка в результате агрегации рассчитывают по

разнице между исходной концентрацией белка и конечной концентрацией белка. Результаты показаны на ФИГ. 2.

Результаты показывают, что общий картофельный белок хорошо растворим при повышенной удельной проводимости даже под действием механических напряжений.

- 5 Удельная проводимость должна составлять по меньшей мере $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно по меньшей мере $8 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. С целью избегания чрезмерного добавления соли при диафильтрации, удельная проводимость предпочтительно должна быть ниже $20 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, более предпочтительно ниже $18 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Предпочтительная удельная проводимость составляет $8\text{--}15 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно $9\text{--}14 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

10

Пример 3

Воду после переработки клубнеплодов, полученную из клубнеплодов картофеля после удаления крахмала и волокон (картофельный сок) применяют в качестве сырья для получения общего изолята нативного белка в экспериментальном масштабе.

- 15 Картофельный сок подвергают предварительной обработке с целью удаления твердых частиц ((а) и (б)) или предварительной обработке путем флокуляции с последующим удалением твердых частиц (в). Во всех случаях обработка происходит при скорости потока от 100 до $250 \text{ л} \cdot (\text{ч} \cdot \text{м}^2)^{-1}$.

(а) Картофельный сок центрифугируют в обычном тарельчатом сепараторе.

- 20 Дальнейшее удаление частиц осуществляют путем тупиковой фильтрации с применением диатомитовой земли в качестве вспомогательной фильтрующей среды. Центрифугированный картофельный сок хранят в резервуаре до дальнейших стадий предварительной обработки.

(б) Картофельный сок подвергают стадии микрофильтрации с помощью

- 25 керамических мембран с размером пор $0,8 \text{ мкм}$ при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$ с постоянным рабочим потоком $100 \text{ л} \cdot (\text{ч} \cdot \text{м}^2)^{-1}$. Микрофильтрованный картофельный сок хранят в резервуаре до дальнейших стадий предварительной обработки.

(в) Картофельный сок предварительно обрабатывают смесью катионных и анионных флокулянтов, как описано в WO 2016/036243A1. Твердые частицы отделяют

- 30 от картофельного сока в тарельчатой центрифуге. Осадок на дне центрифуги удаляют, а надосадочную жидкость используют в качестве сырья для диафильтрации. Образцы флокулированного картофельного сока готовят с учетом модифицированного показателя уплотняемости объема осадка как показателя качества флокуляции. Также проверяют

оптическую плотность надосадочной жидкости при 620 нм. Флоккулированный картофельный сок хранят в резервуаре до дальнейших стадий предварительной обработки.

Характеристики данных стадий предварительной обработки показаны в Таблице

5 1.

Таблица 1. Характеристики воды после переработки картофеля после различных стадий предварительной обработки

Скорость входного потока картофельного сока (л·ч ⁻¹)	Показатель уплотняемости объема осадка (мл·г ⁻¹)	Оптическая плотность при 620 нм
100	49	0,077
150	64	0,076
200	63	0,082
250	71	0,104

- 10 Предварительно обработанный таким образом картофельный сок необязательно подвергают стадии удаления гликоалкалоидов. Удаление гликоалкалоидов проводят с помощью колонки, наполненной гранулированным активированным углем (C-GRAN, Norit). Колонку с активированным углем предварительно замачивают в деминерализованной воде на 24 часа перед проведением стадии удаления
- 15 гликоалкалоидов. Предварительно обработанный картофельный сок пропускают через колонку при длительности контакта 2 часа.

- Во всех случаях предварительная обработка, помимо всего прочего, включает стадию ультрафильтрации, предшествующую стадии диафильтрации. Картофельный сок подвергают ультрафильтрации с помощью мембраны со спиральной намоткой,
- 20 номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 5 кДа, с получением концентрированного раствора картофельного белка с содержанием растворенных твердых частиц от 9,9 до 21,8° по Бриксу.

Таблица 2. Способы обработки и условия получения изолята нативного белка

Эксперименты		1	2	3	4	5	6	7
Предварительная обработка		МФ, УФ	МФ, УФ	Флокк., Центр.,	Центр., УФ	Флокк., Центр.,	Флокк., Центр.,	Флокк., Центр.,

				УФ		УФ	УФ	УФ
		б	б	в	а	в	в	в
Рабочий поток при МФ	(л·(ч·м ²) ⁻¹)	100,0	100,0					
МФ ТМД*	(·10 ⁵ Па)	0,5– 2,5	0,5– 2,5					
Рабочий поток при УФ	(л·(ч·м ²) ⁻¹)	10,0	13,0	12,0	13,8	12,4	12,6	13,2
Т	(°С)	16,4	21,9	21,0	22,5	21,5	19,8	1,02–1,06
УФ ТМД нач.-кон.	(·10 ⁵ Па)	1,04– 1,07	1,04– 1,06	–	1,05– 1,07	1,02– 1,06	1,02– 1,05	15,7
Тв. Частицы нач.-кон.	(° по Бриксу)	5,9– 10,8	5,1– 15,3	5,6– 15,2	5,9– 10,3	5,5– 15,3	5,9– 10,0	5,3–10
σ нач.-кон.	(мСм·см ⁻¹)	13,6– 13,0	9,5– 10,8	9,5– 10,9	8,7–9,1	10,7– 10,1	10,5– 10,3	9,5–10,7
Диафильтрация								
V _{ДФ} :V _{КС}	–	3:1	4:1	3:1	3:1	4:1	3:1	3:1
[Соль]	(%)	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,66	0,33
Массовый расход	(л·(ч·м ²) ⁻¹)	13,0	8,5	10,0	14,9	9,0	14,2	8,8
ТМД* нач.-кон.	(·10 ⁵ Па)	1,05– 1,12	1,04– 1,1	–	1,03– 1,12	1,04– 1,09	1,02– 1,09	1,02–1,05
Т	(°С)	18,5	20,5	22,0	24,7	22,7	22,6	18,5
Тв. частицы нач.-кон.	(° по Бриксу)	10,8– 15,9	15,3– 15,7	15,2–16	10,3– 19,3	15,3– 16,8	10,0– 16,8	10–9,9
σ нач.-кон.	(мСм·см ⁻¹)	13,0– 5,5	10,8– 5,44	10,9– 5,3	9,1–5,1	10,1– 4,5	10,3– 8,4	10,7–6,5
Удаление гликоалкалоидов		Да	Нет	Да	Да	Да	Да	Да
Высушивание		Расп.	Расп.	Расп.	Расп.	Расп.	Расп.	Вымор.
Анализ								
Белок, определяемый по методу Кьельдали	(%)	84,8	80,7	83,7	81,1	85,5	82,2	79,0
Молекулярная масса <	(%)	58,1	55,0	77,4	81,6	66,1	83,2	54,2

35 кДа								
Влажность	(%)	7,73	6,95	8,43	9,24	5,51	7,72	7,62
Общее содержание гликоалкалоидов	($\cdot 10^{-6}$)	120	475	–	43	96,5	26	48
Сульфиты	($\cdot 10^{-6}$)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	7,0
Общее кол-во тяжелых металлов	($\cdot 10^{-6}$)	0,53	0,69	0,61	1,19	0,73	0,79	0,59

*ТМД: трансмембранное давление

Ретентат после ультрафильтрации подвергали дальнейшей обработке, включающей диафильтрацию, проводимую с использованием солевого раствора, содержащего 0,33 или 0,66 масс.% NaCl, при различных отношениях исходной жидкости к солевому раствору (1:3–1:4). В результате был получен раствор изолята картофельного белка. При ультрафильтрации и диафильтрации уровень pH оставался равным $6,3 \pm 0,3$. Конечные концентраты высушивали путем высушивания распылением ($T_{\text{нпч.}} = 175^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{кон.}} = 75^{\circ}\text{C}$) или путем высушивания вымораживанием. Результаты приведены в таблице 2.

Изолят картофельного белка, полученный ультрафильтрацией и диафильтрацией с использованием солевого раствора, характеризуют по удельной проводимости и концентрации растворенных твердых частиц ($^{\circ}$ по Бриксу). Высушенный продукт анализируют на содержание белка (по Кьельдали), влажность, относительное количество ингибитора протеазы, содержание гликоалкалоидов, сульфитов и тяжелых металлов.

В таблице 2 показано влияние различных параметров способа на качество белкового изолята. Все возможные стадии предварительной обработки могут быть успешно применены до проведения диафильтрации, но они не оказывают значительного влияния на качество конечного концентрированного водного изолята белка или высушенного продукта при условии, что диафильтрация проводится с использованием солевого раствора. Стадия удаления гликоалкалоидов необходима для получения картофельного белка с требуемым низким уровнем общего содержания гликоалкалоидов.

Результаты эксперимента 5 свидетельствуют о том, что при диафильтрации воды после переработки картофеля с более высоким коэффициентом разбавления (1:4), удельная проводимость изолята белка ниже, чем в экспериментах с коэффициентом разбавления 1:3. После высушивания продукт из эксперимента 5 также имеет самое высокое содержание белка.

При увеличении концентрации соли с 0,33% до 0,66%, как это было сделано в эксперименте 6, удельная проводимость изолята белка повышается. Однако содержание гликоалкалоидов в высушенном изоляте белка в эксперименте 6 ниже, чем в других экспериментах. Из данных таблицы видно, что изолят белка может быть высушен различными способами, как например высушивание распылением (эксперименты 1–6) или высушивание вымораживанием (эксперимент 7). Во всех случаях был получен продукт с высоким содержанием белка от 79% до 85,5%.

Пример 4

Воду после переработки клубнеплодов, полученную из клубнеплодов картофеля после удаления крахмала и волокон (вода после переработки картофеля), используют в качестве сырья для производства нативного общего изолята белка картофеля в экспериментальном масштабе. Воду после переработки картофеля предварительно очищают от твердых частиц путем микрофльтрации с помощью керамических мембран с размером пор 0,8 мкм при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$ и постоянном рабочем потоке $100 \text{ л} \cdot (\text{ч} \cdot \text{м}^2)^{-1}$. Микрофльтрованную воду после переработки картофеля хранят в резервуаре до дальнейших стадий переработки.

Во всех случаях микрофльтрованный картофельный сок ($4,2\text{--}5,0^\circ$ по Бриксу и $12 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$) подвергают ультрафльтрации с помощью полиэфирсульфоновой мембраны, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 5 кДа или 50 кДа. Это приводит к получению ретентата с содержанием растворенных твердых частиц от $10,5$ до $28,2^\circ$ по Бриксу и удельной проводимостью от 10 до $16 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Далее ультрафльтрованный ретентат картофельного сока подвергают стадии удаления гликоалкалоидов. Необязательно, ретентат разбавляют мягкой водой перед удалением гликоалкалоидов с получением белкового раствора с содержанием растворенных твердых частиц от $10,5$ до $12,9^\circ$ по Бриксу и удельной проводимостью от 6 до $13 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Стадию удаления гликоалкалоидов проводят с помощью четырех колонок, заполненных гидрофобной смолой, при комнатной температуре и уровне pH 6–6,5. После удаления гликоалкалоидов получают раствор белка с удельной проводимостью $8\text{--}13 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, который необязательно концентрируют до содержания твердых веществ в диапазоне $12\text{--}18^\circ$ по Бриксу.

Затем ультрафльтрационный ретентат подвергают дальнейшей обработке, включающей несколько стадий диафльтрации с использованием солевого раствора,

содержащего 0,5 масс.% NaCl или KCl, с удельной проводимостью $8,2 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$ при различных отношениях исходной жидкости (картофельный сок $V_{\text{КС}}$) к солевому раствору ($V_{\text{ДФ}}$) (1:1–1:2). В результате получают раствор изолята картофельного белка. Конечные концентраты необязательно подвергают высушиванию распылением ($T_{\text{нач.}} = 175^\circ\text{C}$, $T_{\text{кон.}} = 75^\circ\text{C}$). Каждая стадия диафильтрации влечет за собой разбавление объема раствора белка $V_{\text{КС}}$ с объемом диафильтрации $V_{\text{ДФ}}$ в указанном соотношении, и концентрирование разбавленного раствора белка до исходного объема путем ультрафильтрации. Результаты представлены в таблице 3.

Изолят картофельного белка, полученный путем ультрафильтрации и диафильтрации с использованием солевого раствора, характеризуют по концентрации растворенных твердых частиц ($^\circ$ по Бриксу). Конечный продукт анализируют на содержание белка, влажность, относительное количество ингибитора протеазы, содержание гликоалкалоидов, сульфита и тяжелых металлов.

В таблице 3 показано влияние различных параметров процесса на качество белкового изолята. Все возможные виды предварительной обработки могут быть успешно применены до начала диафильтрации. Кроме того, были поставлены эксперименты по проведению диафильтрации в различных условиях, из которых следует, что белковый изолят хорошего качества может быть получен с применением различных солевых растворов.

Результаты экспериментов 8 и 9 показывают, что диафильтрация при концентрации соли 0,5% NaCl и отношении белкового раствора к диафильтрату 1:1 или 1:2 и 1:1, соответственно, может быть выполнена с получением изолята картофельного белка хорошего качества (84–86%). На ФИГ. 6 показано, что полученный общий белковый изолят содержит все белковые фракции, которые также присутствуют в исходной жидкости.

В эксперименте 10 микрофильтрованный и ультрафильтрованный картофельный сок подвергают пяти отдельным стадиям диафильтрации (двум перед стадией удаления гликоалкалоидов и трем после удаления гликоалкалоидов) с добавлением 0,5% KCl. Данные условия позволяют получить белковый изолят аналогичного качества по сравнению со случаем, когда при диафильтрации используют соль NaCl (см. ФИГ. 6).

Кроме того, результаты эксперимента 11 показывают, что качество изолята нативного белка может быть улучшено при использовании УФ и ДФ мембраны,

номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 50 кДа, вместо 5 кДа. Такие условия позволяют получить белковый изолят с содержанием чистого белка 94% по сравнению со случаем (приблизительно 84%), когда используется мембрана, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 5 кДа (см. эксперименты 8 и 9).

- 5 Полученный общий белковый изолят содержит все белковые фракции, которые также присутствуют в исходной жидкости (микрофильтрованный картофельный сок) (см. ФИГ. 6).

Таблица 3

	Ед. изм.	8	9	10	11
Предварительная обработка		МФ, УФ	МФ, УФ	МФ, УФ, ДФ	МФ, УФ
УФ мембрана	кДа	5	5	5	50
pH нач.-кон.		5,9–6,1	5,9–6,3	6,1–6,6	6,2–6,5
Тв. частицы нач.-кон.	° по Бриксу	4,8–10,5	4,6–120,2	4,2–19	5,0–28,2
σ нач.-кон.	мСм·см ⁻¹	12–13	12–13	12–16	12–10
Разбавление		Нет	Да	Да	Да
Тв. частицы	° по Бриксу		12,9	12,4	10,9
σ	мСм·см ⁻¹		10	9	6
Диафильтрация					
ДФ мембрана	кДа	5	5	5	50
V _{ДФ} :V _{КС}		1:1	2:1, 1:1	1:1	1:1
Кол-во ДФ стадий		5	2, 1	5	5
ДФ соль		NaCl	NaCl	KCl	NaCl
ДФ [Соль]	(масс.%)	0,5	0,5	0,5	0,5
pH нач.-кон.		6,1–6,2	6,3–6,6	6,6–6,7	6,5–6,5
Тв. частицы нач.-кон.	° по Бриксу	10,5–14,9	12,9–12,1	12,4–12,9	10,9–18,0
σ нач.-кон.	мСм·см ⁻¹	13–9	13–9	9–10	8–7
Высушивание		распыление	распылени	распыление	распылени

			e		e
Анализ					
Чистый белок	масс. %	85,7	84	83	94
Молек. масса < 35 кДа	%		56	58	54
ОСА	масс. %	—	86	84	94
Сахар (общее кол-во)	масс. %	<0,5	<0,5	<0,54	<0,55
ОССА	масс. %	0,83	0,56	0,05	0,98
Сульфиты	мг/кг	7,4			
Общее содержание гликоалкалоидов	мг/кг	142,8	112	27	39
Кадмий	мг/кг	0,54	0,24	0,47	0,51
Ртуть	мг/кг	<0,025	<0,01	<0,01	<0,01
Свинец	мг/кг	0,2	0,28	0,20	<0,1
Мышьяк	мг/кг	0,04	0,07	0,06	0,06
Фосфор	мг/кг	—	5761	5721	2797
Сера	мг/кг	—	14482	13269	13916
Хлор	мг/кг	—	24524	15865	15245
Калий	мг/кг	—	6025	55385	6014
Кальций	мг/кг	—	2061	1154	280
Железо	мг/кг	—	301	323	329
Медь	мг/кг	—	80	67	57
Зола (сырье)	масс. %	6,5	8,2	9,3	4,2

*ОСА: общее содержание азота; ОСНА: общее содержание свободных аминокислот

Пример 5

Воду после переработки клубнеплодов, полученную из клубнеплодов картофеля после удаления крахмала и волокон (вода после переработки картофеля) используют в качестве сырья для получения изолята нативного ингибитора картофельного белка в экспериментальном масштабе. Воду после переработки картофеля предварительно

очищают от твердых частиц путем микрофильтрации с помощью керамических мембран с размером пор 0,8 мкм при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$ и с постоянным массовым расходом $100 \text{ л} \cdot (\text{ч} \cdot \text{м}^2)^{-1}$. Микрофильтрованную воду после переработки картофеля хранят в резервуаре до дальнейших стадий переработки.

5 Микрофильтрованный картофельный сок подвергают ультрафильтрации с помощью мембраны из полиэфирсульфона, номинальное отсечение по молекулярной массе которой составляет 5 кДа, с получением раствора картофельного белка с содержанием растворенных твердых веществ $19,2^\circ$ по Бриксу.

10 Затем уровень pH ультрафильтрованного картофельного сока доводят до 3,0 посредством добавления по каплям 1 М раствора HCl при перемешивании с образованием суспензии ввиду осаждения фракции пататина картофельного сока. Суспензию центрифугируют со скоростью 4200 об./мин в течение 10 минут и декантируют. Из надосадочной жидкости удаляют гликоалкалоиды с помощью четырех колонок, заполненных гидрофобной смолой, при комнатной температуре и уровне pH около 3,5, а
15 затем концентрируют. Концентрат подвергают диафильтрации с помощью мембраны, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 6 кДа, с трехкратным добавлением цитратного буфера с pH 3,5, с последующим трехкратным добавлением 0,5% раствора KCl (отношение концентрата к диафильтрату составляет 5:3) с получением раствора белка с $5,3^\circ$ по Бриксу и содержанием ингибитора протеазы 90% (см. также ФИГ.
20 6).

Результаты приведены в таблице 4. Показано, что регулирование уровня pH до проведения диафильтрации обеспечивает получение белкового изолята хорошего качества, что отражается в содержании чистого белка 81,4%. Кроме того, показано, что
25 данный способ позволяет получить изолят нативного картофельного белка, который обогащен фракцией ингибитора протеазы картофеля.

Таблица 4

	Ед. изм.	12
Предварительная обработка		МФ, УФ, pH, удаление тв. частиц
УФ мембрана	кДа	5
pH нач.-кон.		6,0–3,1
тв. частицы нач.-кон.	$^\circ$ по Бриксу	4,8–8,3
σ нач.-кон.	$\text{мСм} \cdot \text{см}^{-1}$	12–23

Диафильтрация		
Мембрана	кДа	6
$V_{\text{ДФ}}:V_{\text{КС}}$		3:5
Соль		KCl
[Соль]	(%)	0,5
pH нач.-кон.		3,1–3,7
тв. частицы нач.-кон.	° по Бриксу	8,3–5,3
σ нач.-кон.	мСм·см ⁻¹	23–7
Высушивание		нет
Анализ		
Чистый белок	масс. %	81,4
Молек. масса < 35 кДа	%	90
Общее содержание азота	масс. %	81,4
Общее содержание гликоалкалоидов	мг/кг	118
Кадмий	мг/кг	<0,23
Ртуть	мг/кг	<0,23
Свинец	мг/кг	<2,3
Мышьяк	мг/кг	<1,2
Фосфор	мг/кг	814
Сера	мг/кг	14535
Хлор	мг/кг	43023
Калий	мг/кг	52326
Кальций	мг/кг	1395
Железо	мг/кг	277
Медь	мг/кг	133
Зола (сырье)	масс. %	9,3

Пример 6

Микрофильтрованный картофельный сок (300 л) подвергают ультрафильтрации с помощью мембраны, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 5 кДа, с получением концентрированного раствора белка (35 л, 22,7° по Бриксу). Концентрированный раствор белка подвергают диафильтрации с добавлением

50 л воды (отношение концентрата к диафильтрату составляет 7:10). Удельная проводимость уменьшается с $12 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$ (до добавления воды) до $6,2 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$ (после добавления воды). Диафильтрованный раствор снова концентрируют (35 л) с добавлением 50 л воды, что приводит к дальнейшему уменьшению проводимости до $3,5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. При добавлении воды образуется белый осадок, вследствие чего раствор меняет свою консистенцию с прозрачной оранжевого цвета на мутную белого цвета, что указывает на осаждение белка. Далее NaCl (250 г) добавляют для получения прозрачного оранжевого раствора, что приводит к увеличению проводимости до $8 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Зависимость удельной производительности от содержания белка показана на ФИГ. 3. Из данной зависимости следует, что удельная производительность уменьшается на 50% после добавления второго объема воды, что указывает на засорение мембраны. Удельная производительность восстанавливается после добавления NaCl, что указывает на то, что белок снова солюбилизирован.

Данные результаты демонстрируют то, что важно поддерживать удельную проводимость раствора белка выше по меньшей мере $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно по меньшей мере $8 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, с целью избегания осаждения белка, ведущего как к потере белка, так и к загрязнению и засорению мембран. Этой цели можно достичь, контролируя удельную проводимость предварительно обработанной воды после переработки клубнеплодов и/или контролируя удельную проводимость солевого раствора.

Пример 7

Воду после переработки клубнеплодов, полученную из сладкого картофеля и очищенных клубнеплодов кассавы после удаления крахмала и волокон (вода после переработки сладкого картофеля и кассавы), используют в качестве сырья для получения нативного изолята общего белка. Воду после переработки подвергают стадии удаления твердых частиц, которая заключается в ультрафильтрации с помощью ячейки для ультрафильтрации Amicon M-2000, оснащенной мембраной, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 10 кДа.

Ультрафильтрованный сок сладкого картофеля затем подвергают диафильтрации с помощью мембраны, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 10 кДа, с добавлением 0,5% раствора NaCl (отношение концентрата к диафильтрату составляет 1:5). Концентрат подвергают двум дополнительным стадиям

диафильтрации с добавлением 0,5% раствора NaCl (отношение концентрата к диафильтрату составляет 1:2 и 1:1, соответственно) с получением раствора белка.

Ультрафильтрованный очищенный сок кассавы подвергают диафильтрации с помощью мембраны, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 10 кДа, с добавлением 0,5% раствора NaCl (отношение концентрата к диафильтрату составляет 1: 1,5) с получением раствора белка.

Химический состав обработанного клубнеплодного сока показан в таблице 5 в сравнении с необработанным соком.

Таблица 5

		Сок сладкого картофеля (сырье)	ДФ концентрат	Сок кассавы (сырье)	ДФ концентрат
-	-				
Сахар	г/кг СВ	122	30	767	388
Минеральные				278	136
вещества	г/кг СВ	35	111		
Зола	г/кг СВ	н.о.	146	н.о.	167
Калий	г/кг СВ	23	н.о.	218	75
Хлор	г/кг СВ	6	86	6	33
Азот,					
определяемый по				307	241
методу Кьельдали					
(N*6,25)	г/кг СВ	85	669		
Свободные					
аминокислоты	г/кг СВ	12	н.о.	87	9
Чистый белок	г/кг СВ	35	551	119	178

н.о.: не обнаружен

10

Результаты показывают, что данный способ позволяет получить сок из нативных клубнеплодов с высоким содержанием нативного белка. В обоих случаях наблюдалось значительное увеличение содержания чистого белка, в то время как количество загрязняющих веществ, таких как сахар и свободные аминокислоты, было существенно снижено.

15

Пример 8

С целью проверки растворимости белка при естественном уровне pH (6–6,3) и при различной удельной проводимости используют общий картофельный белок, содержащий ингибитор протеазы и пататин. Картофельный белок получают путем микрофильтрации картофельного сока, ультрафильтрации до 10% от первоначального объема и диафильтрации согласно описанию примера 4 (эксперимент 8) без высушивания распылением и с добавлением чистой воды до тех пор, пока удельная проводимость ретентата не достигнет $8 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Полученный водный картофельный белок разбавляют водными растворами NaCl, удельная проводимость которых составляет 3,7, 5,3, 6,7, 9,2 и $14 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, с получением растворов с концентрацией белка 1,3 масс.%. Кроме того, раствор картофельного белка с удельной проводимостью $1,3 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$ и концентрацией белка 1,3 масс.% получают при разбавлении чистой водой.

Затем растворы перемешивают в течение 1 часа перед центрифугированием. Концентрацию белка в надосадочной жидкости определяют с помощью экспресс-анализатора белка Sprint и сравнивают с исходным концентратом белка. Результат показан на ФИГ. 4.

Данный эксперимент показывает, что осаждение белка в водной смеси, содержащей ингибитор протеазы и пататин, является неприемлемым, когда удельная проводимость падает ниже $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Удельную проводимость при диафильтрации необходимо постоянно поддерживать выше $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, а более предпочтительно выше $8 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Пример 9

Белковый изолят, описанный в примере 8, подвергают диафильтрации с использованием растворов NaCl, удельная проводимость которых составляет 1,34, 3,65, 4,72, 5,25, 6,72, 8,72, 9,2, 12, 14 и $49,5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$.

Результаты показаны на ФИГ. 5. Диафильтрация, проводимая с использованием солевого раствора, удельная проводимость которого составляет менее $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, приводит к недопустимому осаждению. Увеличение удельной проводимости до значения более $5 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно более $8 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, обеспечивает приемлемое выделение белка, что позволяет получить улучшенные белковые продукты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения нативного белка клубнеплодов, включающий:

а) переработку по меньшей мере одного клубнеплода с получением воды после переработки клубнеплодов, содержащей нативный белок клубнеплодов;

б) предварительную обработку указанной воды после переработки клубнеплодов, включающую одну или более из следующих стадий:

ба) концентрирование; и/или

бб) разбавление; и/или

бв) регулирование уровня pH; и/или

бг) флоккуляцию; и/или

бд) удаление твердых частиц; и/или

бе) термическую обработку;

где в результате предварительной обработки удельная проводимость предварительно обработанной воды после переработки клубнеплодов, содержащей нативный белок клубнеплодов, составляет $2\text{--}20\text{ мСм}\cdot\text{см}^{-1}$;

в) стадию диафильтрации предварительно обработанной воды после переработки клубнеплодов с использованием солевого раствора, удельная проводимость которого составляет по меньшей мере $5\text{ мСм}\cdot\text{см}^{-1}$, с помощью $3\text{--}500\text{ кДа}$ мембраны, с получением, таким образом, указанного изолята белка клубнеплодов в качестве диафильтрационного ретентата.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что изолят нативного белка клубнеплодов представляет собой изолят нативного белка клубнеплодов, содержащий нативный ингибитор протеазы и нативный пататин.

3. Способ по п.п. 1 или 2, отличающийся тем, что изолят нативного белка клубнеплодов представляет собой общий изолят нативного белка клубнеплодов, определяемый как изолят, содержащий весь белок клубнеплодов в нативной форме.

4. Способ по любому из пп.1–3, отличающийся тем, что способ дополнительно включает стадию удаления гликоалкалоидов с получением изолята белка клубнеплодов, содержащего не более 200 мг/кг гликоалкалоидов.

5. Способ по п.4, отличающийся тем, что стадию удаления гликоалкалоидов выполняют как часть стадии б) или после стадии в).

6. Способ по любому из пп.1–5, отличающийся тем, что указанная переработка для получения воды после переработки клубнеплодов включает перетирание, приготовление пюре, измельчение на терке, дробление, прессование или нарезание клубнеплодов и, необязательно, объединение с водой.
- 5 7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанная переработка дополнительно включает стадию удаления крахмала, такую как декантирование, центрифугирование, циклонирование или фильтрация.
8. Способ по любому из пп.1–7, отличающийся тем, что по меньшей мере один клубнеплод очищают от кожуры перед переработкой.
- 10 9. Способ по любому из пп.1–8, отличающийся тем, что удаление твердых частиц включает стадию фильтрации, центрифугирования, циклонирования, декантирования и/или микрофильтрации, предпочтительно стадию микрофильтрации.
10. Способ по любому из пп.1–9, отличающийся тем, что предварительная обработка включает стадию концентрирования, выбранную из ультрафильтрации, обратного осмоса
- 15 и/или концентрирования вымораживанием, предпочтительно стадию ультрафильтрации.
11. Способ по любому из пп.1–10, отличающийся тем, что стадия ультрафильтрации предшествует стадии диафильтрации.
12. Способ по любому из пп.1–11, отличающийся тем, что предварительная обработка включает в любом порядке стадию ультрафильтрации и стадию микрофильтрации.
- 20 13. Способ по любому из пп.1–12, отличающийся тем, что диафильтрацию проводят с помощью мембран, номинально задерживаемая молекулярная масса которых составляет 5–300 кДа, предпочтительно 5–50 кДа или 50–200 кДа.
14. Способ по любому из пп.1–13, отличающийся тем, что диафильтрацию проводят с использованием солевого раствора, содержащего хлорид, предпочтительно NaCl, KCl или
- 25 CaCl₂.
15. Способ по любому из пп.1–14, отличающийся тем, что удельная проводимость солевого раствора составляет 5–20 мСм·см⁻¹, предпочтительно 5–18 мСм·см⁻¹, более предпочтительно 8–14 мСм·см⁻¹, еще более предпочтительно 9–11 мСм·см⁻¹.
16. Способ по любому из пп.1–15, отличающийся тем, что уровень pH при диафильтрации
- 30 ниже 4,0 или выше 5,5, предпочтительно выше 6,0.
17. Способ по любому из пп.1–16, отличающийся тем, что диафильтрационный ретентат подвергают стадии ультрафильтрации с получением концентрированного изолята белка клубнеплодов.

18. Способ по любому из пп.1–17, отличающийся тем, что любую стадию ультрафильтрации проводят с помощью мембраны, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 5–300 кДа, предпочтительно 30–200 кДа, более предпочтительно 40–120 кДа, еще более предпочтительно 50–100 кДа.
- 5 19. Способ по любому из пп.1–18, отличающийся тем, что в результате первичной диафильтрации или ультрафильтрации образуется пермеат, содержащий свободные аминокислоты клубнеплодов.
20. Способ по п.19, отличающийся тем, что пермеат затем высушивают, предпочтительно путем высушивания распылением и/или высушивания вымораживанием, с получением
10 композиции свободных аминокислот клубнеплодов.
21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что пермеат концентрируют путем ультрафильтрации, обратного осмоса и/или концентрирования вымораживанием перед высушиванием.
22. Способ по любому из пп.1–21, отличающийся тем, что уровень рН изолята белка
15 клубнеплодов доводят до значения выше 2,5, предпочтительно выше 2,75.
23. Способ по любому из пп.1–22, отличающийся тем, что уровень рН изолята белка клубнеплодов доводят до значения ниже 3,5, предпочтительно ниже 3,0.
24. Способ по любому из пп.1–23, отличающийся тем, что изолят белка клубнеплодов затем высушивают с получением порошка нативного белка клубнеплодов.
- 20 25. Способ по п.24, отличающийся тем, что перед высушиванием изолят белка клубнеплодов подвергают дополнительной стадии концентрирования, предпочтительно путем обратного осмоса, выпаривания или концентрирования вымораживанием.
26. Способ по п.24 или 25, отличающийся тем, что перед высушиванием уровень рН изолята белка клубнеплодов доводят до 5,5–7,0, предпочтительно до 6,0–7,0.
- 25 27. Способ по любому из пп.24–26, отличающийся тем, что указанное высушивание осуществляют путем высушивания вымораживанием или высушивания распылением.
28. Способ по любому из пп.1–27, отличающийся тем, что диафильтрационный ретентат содержит, в процентном соотношении от сухого вещества, по меньшей мере 75 масс.% нативного белка клубнеплодов, по большей мере 1,0 масс.% общего количества глюкозы,
30 фруктозы и сахарозы, по большей мере 1 масс.% свободных аминокислот клубнеплодов, по большей мере 10 мг/кг, предпочтительно по большей мере 5 мг/кг сульфита, по большей мере 200 мг/кг, предпочтительно по большей мере 100 мг/кг, более предпочтительно по большей мере 50 мг/кг, еще более предпочтительно по большей мере

25 мг/кг гликоалкалоидов и/или по большей мере 5 мг/кг тяжелых металлов, выбранных из группы, состоящей из кадмия, ртути, свинца и мышьяка.

29. Способ по любому из пп.1–28, отличающийся тем, что способ осуществляют с получением по меньшей мере 5 кг белка в час, предпочтительно по меньшей мере 25 кг

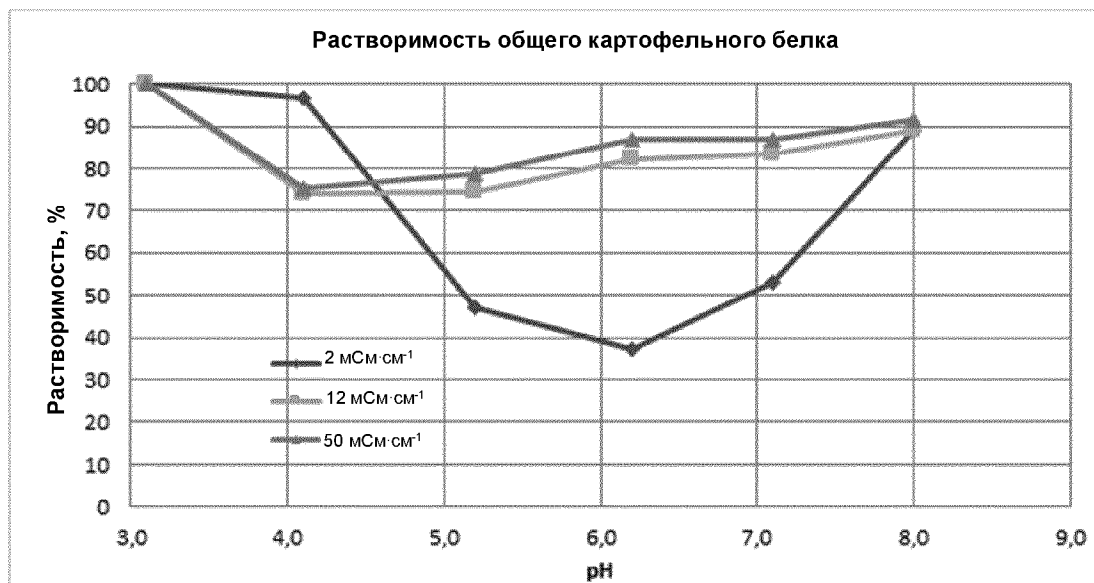
5 белка в час.

30. Изолят белка клубнеплодов, содержащий, в процентном соотношении от сухого вещества, по меньшей мере 75 масс.% нативного белка клубнеплодов, по большей мере 1 масс.% общего количества глюкозы, фруктозы и сахарозы, по большей мере 1 масс.% свободных аминокислот клубнеплодов, по большей мере 10 мг/кг, предпочтительно по

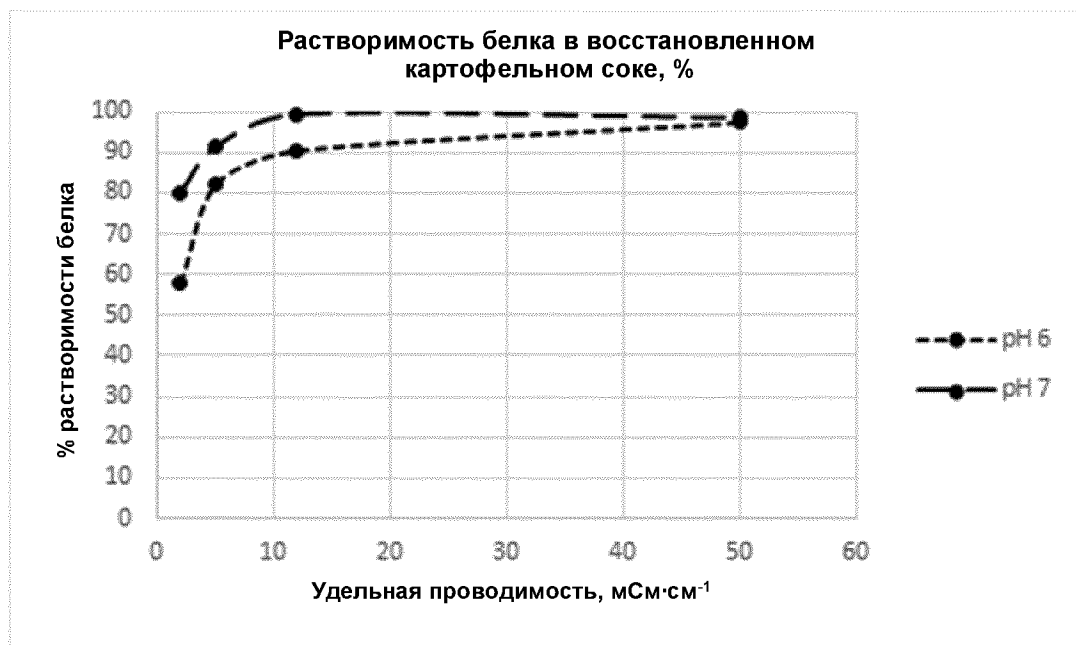
10 большей мере 5 мг/кг сульфита, по большей мере 200 мг/кг, предпочтительно по большей мере 100 мг/кг, более предпочтительно по большей мере 50 мг/кг, еще более предпочтительно по большей мере 25 мг/кг гликоалкалоидов, по большей мере 5 мг/кг тяжелых металлов, выбранных из группы, состоящей из кадмия, ртути, свинца и мышьяка, и по большей мере 5% солей металлов.

15

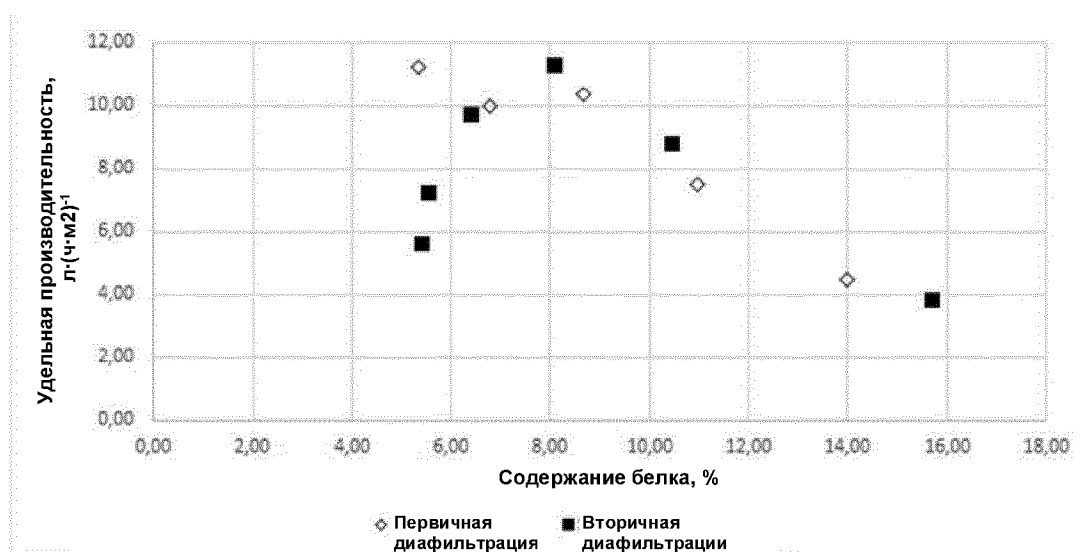
Фигура 1



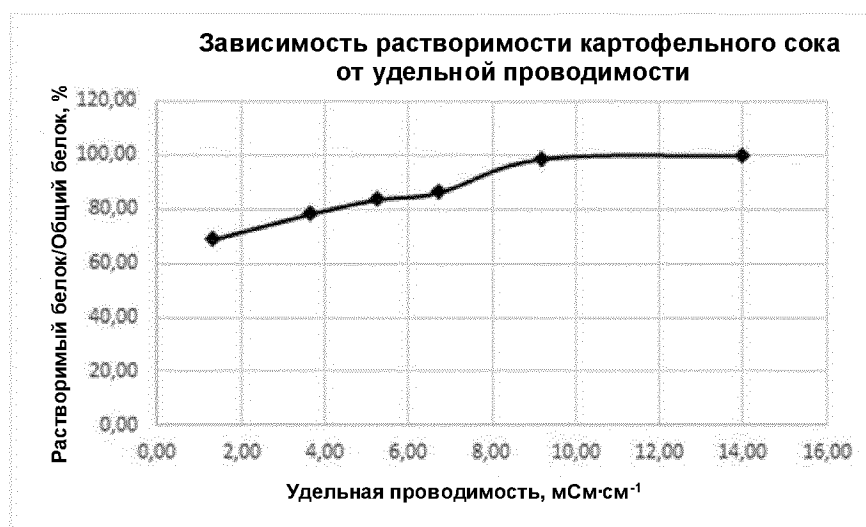
Фигура 2



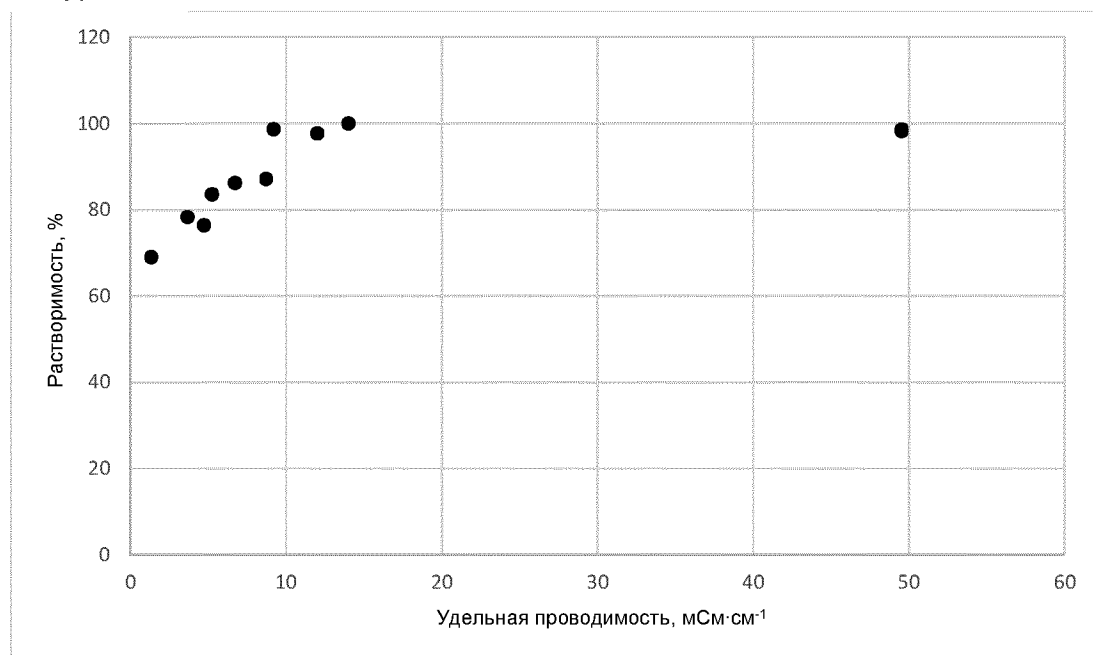
Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6

