

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192702 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.03.05

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

(22) Дата подачи заявки
2020.05.25

(54) ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ИЗ ОЧИЩЕННЫХ КЛУБНЕПЛОДОВ

(31) 19176584.1

(32) 2019.05.24

(33) EP

(86) PCT/NL2020/050333

(87) WO 2020/242299 2020.12.03

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

(72) Изобретатель:
Спелбринк Робин Эрик Якобус (NL)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В изобретении предложен способ получения белкового изолята клубнеплодов, включающий а) очистку по меньшей мере одного клубнеплода, тем самым получая по меньшей мере один очищенный клубнеплод и композицию очистков клубнеплодов; б) обработку указанного по меньшей мере одного очищенного клубнеплода с получением водной жидкости, содержащей белок клубнеплодов; в) выделение белка из указанной водной жидкости с получением указанного изолята белка клубнеплодов. Было обнаружено, что очистка картофеля до выделения белка имеет несколько преимуществ: выделенный сырой белок или его гидролизат является более чистым и имеет состав, обогащенный тирозином, пролином, аргинином глутамином, глутаматом, аспарагином и аспаратом. С другой стороны, белковая композиция, полученная из очистков клубнеплодов, обогащена незаменимыми аминокислотами, такими как треонин, лейцин, изолейцин, метионин и фенилаланин.

A1

202192702

202192702

A1

ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКА ИЗ ОЧИЩЕННЫХ КЛУБНЕПЛОДОВ

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.

В частности, выделение белка клубнеплодов является трудоемким процессом. В основном белок клубнеплодов выделяют из побочных продуктов производства крахмала, которые получают путем дробления или приготовления пюре из цельного картофеля в воде с последующим выделением крахмала. Способ получения крахмала описан в Grommers et al., Starch: Chemistry and Technology, 2009, 3rd edition, p. 511-539. При традиционном производстве крахмала клубнеплоды не очищают, поскольку очистка представляет собой дополнительную стадию, которая не выгодна при производстве крахмала.

Полученная вода после переработки клубнеплодов содержит белок клубнеплодов, который можно выделить различными способами с получением нативного или коагулированного белка.

Выделенный нативный или коагулированный белок, как правило, необходимо дополнительно обработать с целью устранения неприятного привкуса, цвета и тому подобное. Были проделаны множественные попытки очистить побочные продукты производства крахмала с целью удаления некоторых загрязняющих веществ на стадии до выделения белка. Однако, в любом случае данные процессы являются трудоемкими, сложными и дают противоречивые результаты в отношении качества полученного белка. В настоящем изобретении предложен оптимизированный способ выделения белка с улучшенными характеристиками, требующий меньшей очистки жидких технологических потоков.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложен способ получения изолята белка клубнеплодов, включающий:

а) очистку по меньшей мере одного клубнеплода с получением по меньшей мере одного очищенного клубнеплода и композиции очистков клубнеплода;

б) переработку по меньшей мере одного указанного очищенного клубнеплода с получением водной жидкости, содержащей белок клубнеплода;

в) направление указанной водной жидкости на стадию выделения белка с получением указанного изолята белка клубнеплодов.

Было обнаружено, что очистка клубнеплодов до стадии выделения белка имеет ряд преимуществ.

Во-первых, (сырой) белок, полученный из очищенных клубнеплодов, является значительно более чистым в отличие от белка, полученного традиционным способом из цельных (неочищенных) клубнеплодов. Количество сахаров, солей и гликоалкалоидов в сыром белке, полученном из очищенных клубнеплодов, значительно ниже, а микробиологические характеристики белка, полученного из очищенных клубнеплодов, намного лучше. Таким образом, для получения приемлемого конечного белкового продукта требуется менее интенсивная очистка сырого белка, что увеличивает эффективность процесса и уменьшает экологическую нагрузку, обусловленную производством белкового продукта.

Во-вторых, белок, полученный из очищенных клубнеплодов, имеет состав, отличный от состава белка, полученного из цельных (неочищенных) клубнеплодов. Белок, полученный из очищенных клубнеплодов, обогащен тирозином, пролином, аргинином, глутамином, глутаматом, аспарагином и аспартатом, что делает такой белок или его гидролизат более пригодным для применения в пищевых продуктах для человека. Это связано с тем, что а) тирозин, как известно, улучшает функции мозга человека, среди которых бдительность, внимание и концентрация, б) аспартат, глутамат и аргинин улучшают растворимость белка и функциональные свойства, среди которых эмульгирующие

свойства и пенообразующие свойства, и с) после гидролиза белка аминокислоты, такие как глутамин, глутамат, аспарагин и аспартат, как известно, являются важными факторами вкуса умами, а аминокислоты, такие как тирозин и пролин имеют антиоксидантные и антигипертензивные свойства.

- 5 В-третьих, стадия очистки, проведенная до стадии выделения белка, приводит к получению стороннего потока, содержащего очистки клубнеплодов («композиция очистков клубнеплода»). Было обнаружено, что белок, выделенный из очистков клубнеплодов, обогащен многими незаменимыми аминокислотами по сравнению с белком, полученным из цельных (неочищенных) клубнеплодов.
- 10 Такой белок включает незаменимые аминокислоты, в частности, треонин, лейцин, изолейцин, метионин и фенилаланин.

- В данном контексте термин «клубнеплод» должен иметь свое обычное значение и относится к любому типу клубнеплодов. В частности, согласно настоящему определению, клубнеплод включает структуры, которые также можно
- 15 назвать корнеплодом. Таким образом, термин «клубнеплод», в соответствии с определением в настоящей заявке, может быть заменен выражением «корнеплод или клубнеплод».

- Предпочтительно клубнеплод в данном контексте представляет собой съедобный клубнеплод, который может быть выращен с целью производства
- 20 пищевых продуктов для человека. Клубнеплод по своей природе содержит белок; предпочтительные типы клубнеплодов также богаты крахмалом, как например клубнеплоды, применяемые с целью выделения крахмала. Под белком клубнеплодов понимают один тип белка, выделенный из одного типа клубнеплодов, или конкретную белковую фракцию, выделенную из одного типа
- 25 клубнеплодов; однако в особых случаях белок клубнеплодов может содержать смесь белка, выделенного из двух или более типов клубнеплодов.

- 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,
- 30 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*
 5 *tuberosum*).

Предпочтительно белок клубнеплодов включает белок картофеля, белок сладкого картофеля, белок кассавы, белок ямса и/или белок таро. Наиболее предпочтительно указанный изолят белка клубнеплодов представляет собой изолят ингибитора протеазы клубнеплодов, изолят пататина клубнеплодов или общий
 10 изолят клубнеплодов, содержащий смесь ингибитора протеазы и пататина. В данном контексте изолят белка клубнеплодов может содержать нативный белок или денатурированный белок. Нативный белок представляет собой белок, содержащийся в клубнеплоде. Денатурированный белок представляет собой белок, потерявший свою естественную трехмерную структуру. Денатурированный белок
 15 имеет тенденцию к коагуляции с образованием мелких частиц («коагулированный белок»), которые могут быть применены в пищевых продуктах или дополнительно обработаны.

В данном контексте изолят представляет собой белок клубнеплодов, полученный настоящим способом, в растворе (например, в количестве 0,5-25
 20 масс.%, предпочтительно 3-20 масс.%, более предпочтительно 5-18 масс.%) или после высушивания в виде порошка.

Первая стадия настоящего способа включает очистку по меньшей мере одного клубнеплода, тем самым получая по меньшей мере один очищенный клубнеплод и композицию очистков клубнеплодов. В данном контексте под
 25 очисткой понимают по меньшей мере частичное удаление очистков клубнеплодов. Очистки представляют собой внешний слой или кожицу клубнеплода, находившуюся в контакте с почвой, в которой был выращен клубнеплод. Очистка обычно включает не только удаление кожицы, но и по меньшей мере части верхнего слоя и/или мякоти, которая находится непосредственно под кожей.

30 Предпочтительно, очистка в данном контексте означает удаление наружного слоя клубнеплода, причем указанный наружный слой имеет среднюю толщину 0,2-5 мм,

предпочтительно 0,5-3 мм. В результате получают очищенные клубнеплоды, которые в данном контексте также можно назвать мякотью клубнеплодов.

5 Многие традиционные методы очистки позволяют удалить только доступные части, то есть, например, трещины и глубокие ямки в картофеле остаются на месте. Несмотря на то, что такого рода очистка является достаточной для получения по меньшей мере частичных преимуществ настоящего способа, очистка предпочтительно означает полное удаление наружного слоя клубнеплодов, то есть всего наружного слоя, находившегося в контакте с почвой во время выращивания клубнеплодов.

10 Способы очистки клубнеплодов общеизвестны. Например, очистка может быть проведена с помощью ножа с удалением наружного слоя. Однако в промышленном масштабе очистку предпочтительно проводят путем механической или паровой очистки.

15 В данном контексте механическая очистка включает истирание, очистку щеткой, нарезание, измельчение на терке или иное механическое удаление (по меньшей мере части) наружного слоя клубнеплодов. Такие методы являются общеизвестными.

Известна также паровая очистка, которая включает стадию воздействия паром на клубнеплоды с целью удаления наружного слоя. Паровая очистка может 20 применяться в сочетании с механической очисткой.

На стадии b) настоящего способа по меньшей мере один очищенный клубнеплод перерабатывают с получением водной жидкости, содержащей белок клубнеплодов. Такая переработка включает, например, перетирание, приготовление пюре, измельчение на терке, дробление, прессование или нарезание 25 клубнеплодов и, необязательно, с добавлением воды, с получением указанной водной жидкости, содержащей белок клубнеплодов. Такая водная жидкость также может быть названа соком клубнеплодов или водой после переработки клубнеплодов.

Сок клубнеплодов обычно содержит крахмал, и его можно подвергнуть 30 стадии удаления крахмала, например, путем декантирования, циклонирования или

фильтрации, как известно в данной области техники, для получения водной жидкости, содержащей белок клубнеплодов. Согласно данному варианту реализации водная жидкость предпочтительно является побочным продуктом производства крахмала, например картофельным соком (PFJ), полученным после
5 выделения крахмала в картофельной промышленности. Предпочтительно, сок клубнеплодов подвергают стадии удаления крахмала перед стадией выделения белка.

Согласно другим вариантам реализации, очищенный клубнеплод перерабатывают путем нарезания с целью придания формы, которая является
10 основой для продуктов из переработанных клубнеплодов, таких, как например, чипсы и картофель фри. Нарезание в присутствии воды приводит к получению водной жидкости, содержащей белок клубнеплодов.

Согласно одному варианту реализации, клубнеплод может быть переработан струйным потоком воды для нарезания клубнеплода. Согласно
15 другому варианту реализации, клубнеплод может быть переработан путем нарезания с помощью ножей, например, в присутствии воды. Жидкость, получаемая в результате таких процессов нарезания, содержит белок клубнеплодов и, следовательно, представляет собой водную жидкость, содержащую белок клубнеплодов на стадии b).

20 Переработка может дополнительно включать одну или более стадий, выбранных из микрофильтрации, диафильтрации, флокуляции, концентрирования, добавления сульфитов, удаления гликоалкалоидов, импульсной обработки электрическим полем, регулирования уровня pH и/или других стадий, обычно применяемых в клубнеплодной промышленности.

25 Регулирование уровня pH может быть выполнено с помощью различных кислот и/или оснований. Подходящие кислоты представляют собой, например, соляную кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, муравьиную кислоту, фосфорную кислоту, серную кислоту и молочную кислоту; подходящее основание представляет собой, например, гидроксид натрия или калия, хлорид аммония,
30 карбонат натрия или калия, оксиды и гидроксиды кальция и магния.

Удаление гликоалкалоидов может быть выполнено с использованием подходящих адсорбентов, как известно в данной области техники, таких как, например, гидрофобные адсорбенты, например, активный уголь или слоистый силикат. В предпочтительных вариантах реализации указанная обработка также
 5 позволяет удалить пектины, полифенолы и проантоцианидины и их окрашенные производные, таких как эпикатехины и антоцианы.

Флокуляция может быть выполнена путем добавления соответствующих флокулянтов. Подходящие флокулянты включают, например, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, катионный или анионный полиакриламид, хитозан и каррагинан. В
 10 предпочтительных вариантах реализации коагулянт может быть добавлен для улучшения флокуляции, предпочтительно катионный или нейтральный коагулянт или полимерный силикат. В связи с этим дается ссылка на WO/2016/036243.

Микрофильтрация (МФ) может быть выполнена с отделением частиц от жидкости. Микрофильтрацию можно проводить с помощью различных мембран, изготовленных из полисульфона, поливинилиденфторида (ПВДФ),
 15 полиакрилонитрила (ПАН) и полипропилена (ПП), а также с помощью керамических мембран, изготовленных из циркония, титановых мембран или оксида алюминия. Микрофильтрация может быть выполнена как при постоянном давлении, так и при постоянном рабочем потоке. Давление может варьироваться от
 20 $1,5 \cdot 10^5$ Па 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 $350 \text{ л} \cdot (\text{ч} \cdot \text{м}^2)^{-1}$.

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.

Предпочтительно, уровень pH жидкости, подлежащей микрофильтрации, составляет 5,5–7,0, предпочтительно 5,5–6,0 или 6,0–7,0. Кроме того, предпочтительно общее количество растворимых твердых частиц, измеренное в градусах по Бриксу, составляет от 3 до 10° по Бриксу, предпочтительно от 4 до 6° по Бриксу. Кроме того, предпочтительно, удельная
 25 проводимость жидкости составляет $2,0\text{--}30 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, предпочтительно $2,5\text{--}20 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$, более предпочтительно $5\text{--}20 \text{ мСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Микрофильтрация приводит к
 30

тому, что оптическая плотность микрофильтрованной жидкости при 620 нм предпочтительно становится ниже 0,2, более предпочтительно ниже 0,1. Микрофилтрация может быть выполнена при коэффициенте разделения потока, определяемом как соотношение между подаваемым потоком и потоком пермеата (безразмерная величина), в диапазоне значений от 1,0 до 6,0, предпочтительно от 1,0 до 4,0.

Диафилтрация (ДФ) представляет собой стадию разбавления с применением воды или солевого раствора. Основным назначением диафилтрации является удаление малых молекул с пермеатом, при этом сохраняя в ретентате большие молекулы, как например, белки. Предпочтительно диафилтрацию проводят с применением солевого раствора. Примером подходящих солей являются хлоридсодержащие соли, как например, NaCl, KCl и CaCl₂. Удельная проводимость солевого раствора предпочтительно составляет 5-50 мСм·см⁻¹, предпочтительно 5-20 мСм·см⁻¹, более предпочтительно 8-15 мСм·см⁻¹. Диафилтрацию предпочтительно проводят при степени разбавления от 1:1 до 1:10, предпочтительно от 1:1 до 1:5.

Предпочтительные значения номинально задерживаемой молекулярной массы при диафилтрации составляют 5-300 кДа, предпочтительно 2-200 кДа, более предпочтительно 3-150 кДа, как например, 5-20 кДа или 5-10 кДа, или 50-150 кДа, предпочтительно 50-100 кДа.

Концентрирование может быть выполнено, например, путем ультрафилтрации, обратного осмоса или лиофилизации, как известно в данной области техники.

Добавление сульфита является распространенной стадией при переработке картофельного крахмала, которую применяют для предотвращения окисления технологических потоков.

Обработка импульсным электрическим полем является распространенной стадией в картофелеперерабатывающей промышленности, которую применяют для изменения свойств мякоти картофеля, таких как скорость высушивания, прочность и мягкость.

На стадии с) настоящего способа водную жидкость, содержащую белок клубнеплодов, подвергают стадии выделения белка с получением указанного изолята белка клубнеплодов. Способы выделения белка из водных жидкостей, содержащих белок клубнеплодов, являются общеизвестными. Можно выделить
5 два подхода.

Согласно одному варианту реализации, результатом выделения белка является выделение нативного белка клубнеплодов. Указанный изолят нативного белка клубнеплодов может содержать изолят ингибитора протеазы клубнеплодов, изолят пататина клубнеплодов или общий изолят клубнеплодов, причем общий
10 изолят клубнеплодов содержит смесь ингибитора протеазы клубнеплодов и пататина клубнеплодов. Например, изолят нативного пататина клубнеплодов может иметь изоэлектрическую точку ниже 5,8, предпочтительно 4,8-5,5, и молекулярную массу более 30 кДа, предпочтительно более 35 кДа. Изолят нативного ингибитора протеазы клубнеплодов может иметь изоэлектрическую
15 точку выше 5,5, предпочтительно выше 5,8, и молекулярную массу ниже 35 кДа, предпочтительно от 4 до 30 кДа.

В данном контексте термин «нативный» означает, что белок, который в природе содержится в клубнеплоде, как определено в настоящей заявке, экстрагируется из указанного клубнеплода без значительного воздействия на
20 белок. Таким образом, нативный белок существенно не деградирует и существенно не денатурируется. То есть порядок аминокислот и трехмерная структура практически не нарушены по сравнению с белком, содержащимся в клубнеплодах. Предпочтительными способами выделения нативного белка являются ультрафильтрация, диафильтрация, абсорбция и хроматография.

25 Наиболее предпочтительным способом выделения нативного белка клубнеплодов является диафильтрация (ДФ) и/или ультрафильтрация (УФ). С помощью ультрафильтрации и диафильтрации разделяют растворенные вещества с молекулярной массой в диапазоне от 5 кДа до 500 кДа, поэтому эти стадии можно применять для отделения белка от низкомолекулярных растворенных веществ.
30 Таким образом, нативный белок клубнеплодов можно получить из ретентата при ультрафильтрации или диафильтрации.

УФ мембраны также можно применять при диафильтрации; диаметр их пор находится в диапазоне от 1 до 20 нм. Предпочтительными УФ мембранами являются анизотропные УФ мембраны. Предпочтительно мембрана для ультрафильтрации содержит регенерированную целлюлозу, полиэфирсульфоны (ПЭС) или полисульфон (ПС). 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.

Способность УФ мембраны удерживать макромолекулы традиционно определяют с точки зрения ее номинально задерживаемой молекулярной массы. Значение номинально задерживаемой молекулярной массы 10 кДа означает, что мембрана может удерживать из исходного раствора 90% молекул с молекулярной массой 10 кДа. В данном контексте предпочтительными мембранами являются мембраны со значением номинально задерживаемой молекулярной массы 3-300 кДа, предпочтительно 3-200 кДа, более предпочтительно 3-150 кДа, как например, 5-20 кДа или 5-10 кДа, или 50-150 кДа, предпочтительно 50-100 кДа. Уровень pH водной жидкости, подвергаемой ультрафильтрации, предпочтительно составляет менее 4,0 или более 5,5, с целью предотвращения быстрого засорения мембран. Дополнительно удельная проводимость водной жидкости предпочтительно составляет 5-20 мСм·см⁻¹, предпочтительно 8-14 мСм·см⁻¹, более предпочтительно 9-13 мСм·см⁻¹.

При необходимости удельную проводимость можно регулировать путем добавления различных солей, таких как NaCl, KCl, CaCl₂ или NaHSO₃, предпочтительно NaCl, и/или путем добавления кислоты или основания, согласно определению, указанному в других источниках.

Изолят ингибитора протеазы предпочтительно получают с использованием мембраны ПЭС или ПС с номинально задерживаемой молекулярной массой 2-30 кДа, предпочтительно 3-25 кДа или 5-20 кДа. Изолят ингибитора протеазы может быть подвергнут ультрафильтрации при значении pH 3,2-7,0, предпочтительно 3,2-4,5.

Изолят пататина предпочтительно получают с помощью мембраны из ПЭС, ПС или регенерированной целлюлозы с номинально задерживаемой молекулярной массой 5-30 кДа, более предпочтительно 5-20 кДа, еще более предпочтительно 5-10 кДа. Изолят пататина предпочтительно подвергают ультрафильтрации при уровне рН менее 4,0 или более 5,5. После удаления примесей уровень рН может быть увеличен до 8,0-12,0, предпочтительно 9,0-11,0, с целью обеспечить сильные потоки через мембраны и более длительное время работы (эксплуатации).

Общий изолят клубнеплодов предпочтительно получают с помощью ультрафильтрационной мембраны из ПЭС, ПС, регенерированной целлюлозы, номинально задерживаемая молекулярная масса которой составляет 2-50 кДа, более предпочтительно 3-30 кДа, более предпочтительно 5-20 кДа, еще более предпочтительно 5-10 кДа. Общий изолят клубнеплодов предпочтительно подвергают ультрафильтрации при уровне рН менее 4,0 или более 5,5. После удаления примесей уровень рН может быть увеличен до 8,0-12,0, предпочтительно 9,0-11,0, с целью обеспечить сильные потоки через мембраны.

Согласно предпочтительному варианту реализации, изолят белка клубнеплодов, полученный в результате ультрафильтрации, содержит более 75% от содержания сухого вещества. Согласно настоящему способу, содержание белка определяют как содержание азота по методу Кьельдали, умноженное на 6,25. Предпочтительно содержание белка в изоляте белка клубнеплодов составляет более 80 масс.%, более предпочтительно более 90 масс.% и еще более предпочтительно более 95 масс.%.

Согласно предпочтительным вариантам реализации, изолят белка клубнеплодов, полученный в результате ультрафильтрации, затем подвергают диафильтрации (ДФ) с целью (дополнительного) удаления растворимых компонентов. Диафильтрацию предпочтительно проводят на той же установке, что и ультрафильтрацию, предпочтительно с помощью той же мембраны. Диафильтрацию можно проводить с применением воды или солевого раствора, например, солевого раствора, содержащего NaCl, KCl и/или CaCl₂, например, при удельной проводимости 5-20 мСм·см⁻¹, предпочтительно 8-14 мСм·см⁻¹, более

предпочтительно 9-11 мСм·см⁻¹. Предпочтительные значения рН при проведении диафильтрации являются такими, как описано в настоящей заявке для ультрафильтрации. Диафильтрацию проводят при степени разбавления от 1:1 до 1:10 (ретентат ультрафильтрации - вода или солевой раствор), предпочтительно 1:5, более предпочтительно 1:4, 1:3 или 1:2. Результатом является диафильтрация ретентата, содержащего в процентах от сухого вещества по меньшей мере 75 масс.% нативного белка картофеля и предпочтительно по большей мере 0,05 масс.% общего количества глюкозы, фруктозы и сахарозы и по большей мере 1 масс.% свободных аминокислот картофеля. При проведении диафильтрации с применением солевого раствора предпочтительно концентрировать ретентат путем ультрафильтрации.

Еще одним наиболее предпочтительным способом выделения белка является абсорбция, например, путем смешанной хроматографии, которая может быть проведена, например, способом, описанным в EP 2 083 634, WO2014/011042, или другими способами, известными в данной области техники.

Кроме того, нативный белок клубнеплодов может быть выделен путем хроматографии, как например, катионообменной хроматографии или анионообменной хроматографии, как известно в данной области техники. Другие способы выделения нативного белка клубнеплодов включают изоэлектрическое фокусирование, изоэлектрическое осаждение и комплексообразование, как известно в данной области техники.

Согласно другому варианту реализации, выделение белка включает стадию денатурирования белка клубнеплодов с последующим выделением денатурированного белка клубнеплодов. Подходящие способы известны в данной области техники и предпочтительно включают кислотную коагуляцию, тепловую коагуляцию, изоэлектрическое осаждение и комплексообразование. Общеизвестно, что изоэлектрическое осаждение и комплексообразование приводят к образованию смеси нативного и денатурированного белка, что позволяет выделять как нативный, так и денатурированный белок.

Коагуляция подразумевает денатурацию белка с получением денатурированного (коагулированного) белка. Подходящими методами для этого

являются нагревание белка или обработка белка кислотой, что приводит к получению суспензии коагулированного белка, который впоследствии может быть отфильтрован, циклонирован, декантирован или иным образом отделен для выделения коагулированного белка из водной жидкости. Данные методы хорошо известны в данной области техники. Кислотная коагуляция и тепловая коагуляция являются наиболее предпочтительными способами получения изолята белка клубнеплодов в соответствии со стадией с).

Дополнительными предпочтительными способами являются изоэлектрическое осаждение и комплексообразование, с помощью которых также можно выделить денатурированный белок клубнеплодов в соответствии со стадией с). Данные методы также общеизвестны.

В любой момент указанного способа уровень pH может быть отрегулирован путем добавления кислоты или основания. Подходящие кислоты представляют собой, например, соляную кислоту, лимонную кислоту, уксусную кислоту, муравьиную кислоту, фосфорную кислоту, серную кислоту; подходящее основание представляет собой, например, гидроксид натрия или калия, хлорид аммония, карбонат натрия или калия, оксиды и гидроксиды кальция и магния. Регулирование уровня pH может служить различным целям: оно может привести к осаждению определенных компонентов водной жидкости, которые впоследствии могут быть удалены на стадии удаления твердых частиц, как например, фильтрация, микрофильтрация, циклонирование и тому подобное. Регулирование уровня pH может дополнительно повысить растворимость белковой фракции, что позволяет улучшить процесс ультрафильтрации и/или диафильтрации. Уровень pH также влияет на стабильность белка, тем самым позволяя контролировать процесс.

Согласно другим предпочтительным вариантам реализации, композицию очистков клубнеплодов отдельно подвергают одной или более дополнительным стадиям обработки. Преимущество заключается в том, что можно получить вторичный изолят белка клубнеплодов. Вторичный изолят белка клубнеплодов представляет собой изолят белка, полученный из композиции очистков клубнеплодов. Было обнаружено, что указанный вторичный изолят белка клубнеплодов имеет состав, в частности, аминокислотный состав, отличный от

состава изолята белка клубнеплодов, полученного из (неочищенной) мякоти клубнеплодов. Вторичный изолят белка клубнеплодов содержит повышенное количество незаменимых аминокислот, как например треонин, лейцин, изолейцин, метионин и фенилаланин, по сравнению с изолятом белка клубнеплодов, полученным из неочищенных клубнеплодов. В частности, это может быть полезно при применении указанного вторичного изолята белка клубнеплодов в пищевых продуктах для человека.

Дальнейшие стадии обработки с получением продуктов из очистков клубнеплодов, могут быть аналогичны описанным выше стадиям обработки с получением продуктов из мякоти картофеля. Таким образом, дополнительные стадии обработки могут быть выбраны из группы, состоящей из флокуляции, фильтрации, удаления гликоалкалоидов, выделения белка, гидролиза белка, микрофильтрации, высушивания и тому подобного. Белок может быть выделен путем кислотной коагуляции, тепловой коагуляции, изоэлектрического осаждения, комплексообразования, ультрафильтрации, диафильтрации, абсорбции или хроматографии, как описано в настоящей заявке.

Согласно предпочтительному варианту реализации, очищенные клубнеплоды и продукты, полученные из очистков клубнеплодов, обрабатывают отдельно с получением первичного изолята белка клубнеплодов, выделенного из клубнеплодов, и вторичного изолята белка клубнеплодов, выделенного из очистков клубнеплодов. Это означает, что водные жидкости, содержащие белок клубнеплодов, полученный путем обработки очищенных клубнеплодов или очистков клубнеплодов, предпочтительно не объединяют и не подвергают дальнейшей совместной обработке на любом этапе способов получения изолята белка клубнеплодов, как описано в настоящей заявке.

Преимущественно продукты первичного и вторичного изолята белка клубнеплодов имеют различающиеся композиции, в частности, различающиеся аминокислотные композиции. Это может быть полезно для различных применений, в частности, при производстве пищевых продуктов необходимы различные аминокислотные композиции, например, для придания вкуса или применения в медицинских целях. Таким образом, отдельная обработка

очищенных клубнеплодов и очистков клубнеплодов согласно настоящему способу позволяет получить первичный и вторичный продукты изолята белка клубнеплодов с различными аминокислотными композициями.

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

10 Преимущество настоящего способа заключается в том, что полученная композиция сырого белка клубнеплодов является значительно более чистой, в отличие от других композиций сырого белка клубнеплодов. В связи с этим, термин «сырой» относится к композиции белка, полученной непосредственно в процессе выделения. Таким образом, термин «сырой» относится к композиции белка перед
15 любой стадией очистки или рафинирования, которой может быть подвержен выделенный сырой белок, с целью сделать его пригодным для предполагаемого применения, например, для применения в кормах для животных или для применения в пищевых продуктах для человека.

Преимущество заключается в том, что сырой белок, полученный настоящим способом, требует значительно меньшей очистки и/или
20 рафинирования, как например, удаление гликоалкалоидов, удаление хлорогенных кислот, удаление сахаров (определяемых как общее количество глюкозы, сахарозы и фруктозы), удаление солей, в частности солей калия, и/или удаление свободных аминокислот.

Это преимущественно приводит к снижению стоимости, трудозатрат и
25 времени, необходимых для получения чистого изолята белка клубнеплодов, пригодного для дальнейшего применения. Кроме того, переработка довольно чистого сырого белка преимущественно вызывает меньшее образование накипи и загрязнений в оборудовании ввиду присутствия меньшего количества примесей и, таким образом, приводит к увеличению срока службы оборудования. Кроме того,
30 рафинирование более чистого сырого белка требует применения меньшего

количества химических веществ и других материалов, в результате чего образуется меньше отходов, что значительно снижает нагрузку на окружающую среду.

Следовательно, изобретение дополнительно относится продукту сырого белка клубнеплодов, содержащему менее 80 мг/кг сахаров, выбранных из группы, состоящей из сахарозы, глюкозы и фруктозы, предпочтительно менее 60 мг/кг сахаров, более предпочтительно менее 45 мг/кг, в частности, менее 30 мг/кг. Кроме того, сырой белок клубнеплодов предпочтительно содержит менее 1500 мг/кг, предпочтительно менее 1200 мг/кг, еще более предпочтительно менее 1000 мг/кг, в частности, менее 500 мг/кг гликоалкалоидов.

В частности, переработка сырого белка клубнеплодов, который имеет низкое содержание сахара, в частности, низкое содержание сахарозы, глюкозы и фруктозы, является предпочтительной, поскольку сахара, как известно, трудно удалить из белковых композиций, в частности, из коагулированных белковых продуктов. Кроме того, присутствие сахаров в белковых продуктах снижает их органолептические свойства, такие как вкус и ощущение во рту, что снижает пригодность этих белков для употребления в пищу.

Аналогичным образом, присутствие гликоалкалоидов в продуктах белка клубнеплодов также снижает органолептические свойства, такие как вкус и ощущение во рту, что является нежелательным.

Таким образом, подвергая сырой белок с низким содержанием сахара и гликоалкалоидов, как определено в настоящей заявке, дальнейшим стадиям рафинирования или очистки с получением изолята чистого белка, значительно повышают эффективность способа со всеми сопутствующими преимуществами, как описано в других источниках.

Еще одним преимуществом является то, что сырой белок, полученный настоящим способом, содержит малое количество микроорганизмов. Количество микроорганизмов может быть определено путем подсчета общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов на чашке Петри в соответствии с ISO 4833-1/2013 ниже 10^4 КОЕ/грамм, предпочтительно ниже 10^3 КОЕ/грамм.

В целях ясности и полноты описания признаки описаны в настоящей заявке в контексте тех же или отдельных вариантов реализации, однако следует понимать, что объем изобретения может включать варианты реализации, включающие комбинации всех или некоторых из описанных признаков. Ниже
5 приведены иллюстративные примеры, которые никоим образом не ограничивают заявленный объем притязаний.

ПРИМЕРЫ

Концентрацию белка определяют с помощью экспресс-анализатора
10 белка Sprint (компания СЕМ), откалиброванного по методу Кьельдали. Экспресс-анализатор белка Sprint измеряет потерю сигнала белок-связывающего красителя. Чем выше потеря сигнала, тем больше белка присутствует. Данная система откалибрована по методу Кьельдали на образцах белка, подвергнутого интенсивному диализу, так что весь обнаруженный азот происходит от белка, а не
15 от свободных аминокислот, пептидов или других источников азота. Затем азотное число преобразуют в содержание белка путем умножения на 6,25.

Аминокислотный анализ фракций белка картофеля проводят с помощью аминокислотных анализаторов HPLC-UV/FLU и/или Biochrom путем классической ионообменной жидкостной хроматографии с постколоночной
20 дериватизацией нингидрина и фотометрическим детектированием, как известно в данной области техники.

Содержание сахара определяют с помощью ферментативного анализа, опубликованного Megazyme (Ирландия). Данный способ основан на применении набора для анализа сахарозы/фруктозы/D-глюкозы (арт. K-SUFRG) и включает
25 воздействие ультрафиолетовых лучей для определения сахарозы, D-фруктозы и D-глюкозы в пищевых продуктах, напитках и других материалах.

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

Tri-glycoalkaloids 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 (PALL PN 4556T) 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 твдофазной экстракции (Oasis HLB prospect-2/картридж Symbiosis 2,0 x 10 мм, размер частиц 30 мкм) через систему твдофазной 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).

Микробиологические характеристики были определены в соответствии с ISO 4833-1/2013.

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

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

Пример 1

Две партии картофеля весом 10 кг (сорт Novano, от Averis Seeds, NL, и сорт Bildstar, приобретенный в местном супермаркете) были разделены на две порции по 5 кг. Одну порцию картофеля очищали путем механического истирания

на очистителе (Machinefabriek Duurland, NL), а другую порцию перерабатывали без очистки.

5 Все порции отдельно нарезали на куски и перетирали на кухонном комбайне Braun с получением картофельного сока. Сок декантировали из крахмала и фракции клетчатки, фильтровали через фильтровальную бумагу Whatman и затем пропускали через сито с размером отверстий 90 мкм.

10 Полученные таким образом соки двух разновидностей очищенного и неочищенного картофеля нагревали на кипящей водяной бане до достижения температуры 80°C и дополнительно выдерживали при этой температуре в течение десяти минут с целью коагуляции белка. Затем белок выделяли путем центрифугирования при температуре окружающей среды в течение 10 минут с помощью центрифуги Heraeus Multifuge SR (4700 об./мин).

15 Выделенный таким образом белок замораживали и анализировали на гликоалкалоиды, аминокислотный состав, металлы, сахара и микробиологические характеристики.

Результаты

20 Аминокислотный анализ фракций белка картофеля показал, что очистка привела к ряду различий в химическом составе белка (таблица 1); как для сорта Novano, так и для сорта Bildstar очистка привела к повышению количества аспарагиновой кислоты и аспарагина, глутаминовой кислоты и глутамина, тирозина, пролина и аргинина.

25 Напротив, очистка приводила к снижению количества незаменимых аминокислот, таких как треонин, изолейцин, лейцин, лизин, и условно незаменимой аминокислоты цистеин, а также снижению количества глицина.

Таблица 1. Состав картофельного белка, выделенного из очищенного и неочищенного картофеля (нормализованный белковый состав, в граммах аминокислоты на кг белка)

Аминокислоты	Очищенный	Неочищенный	Очищенный	Неочищенный	Количество после очистки (%)	
	Bildstar	Bildstar	Novano	Novano	Bildstar	Novano
Asx	134	143	127	127	9,4	0,4
Tyr	46	55	60	57	8,9	2,7
Arg	47	47	47	46	0,8	1,3
Glx	100	102	102	101	2,6	1,1
Pro	46	47	46	45	0,7	0,6
Gly	50	49	48	49	-1,4	-0,5
Ala	41	41	42	43	0,0	-0,9
Val	64	61	62	62	-3,4	0,2
Ser	55	56	53	54	0,9	-1,5
Cys	21	19	19	20	-2,3	-0,6
Trp	17	18	17	17	1,1	-0,1
His	19	19	20	21	-0,3	-0,1
Lys	72	72	73	73	-0,1	-0,2
Met	18	16	20	20	-2,1	0,3
Phe	62	60	62	62	-1,7	0,3
Ile	54	50	50	51	-4,1	-0,7
Leu	96	95	95	96	-1,5	-1,1
Thr	59	51	55	56	-7,5	-1,2

Аминокислоты, выделенные **жирным шрифтом**, являются незаменимыми

5 аминокислотами у человека.

Таблица 2. Химический состав очищенного и неочищенного картофеля сорта Bildstar

[масса на кг сухого вещества]	Bildstar очищенный	Bildstar неочищенный
Сырой белок (Кьельдали, 6,25; г/кг)	756	762
Общее содержание гликоалкалоидов (мг/кг)	576	1868
Сырая зола (550°C; г/кг)	50	79
Общее содержание сахаров (г/кг)	28,9	43,3
Сахароза (г/кг)	10,0	14,0
Фруктоза (г/кг)	9,4	15,2
Глюкоза (г/кг)	9,4	14,0
Кальций (г/кг)	0,4	0,7
Железо (мг/кг)	161,1	213,4
Калий (г/кг)	22,4	36,1
Медь (мг/кг)	34,4	56,7
Магний (г/кг)	1,2	1,8
Натрий (г/кг)	0,2	0,3
Цинк (мг/кг)	42,8	52,4
Алюминий (мг/кг)	не обнаружен	61,0
Кадмий (мг/кг)	0,41	0,46
Нитрат (мг/кг)	550	1159

В таблице 2 показано, что очистка клубнеплодов приводит к образованию белка картофеля со значительным и значимым более низким уровнем загрязняющих веществ, таких как гликоалкалоиды, сахара и нитрат.

Пример 2

Результаты из примера 1, по всей вероятности, показывают, что очистка клубнеплодов оказывает более сильное влияние в случае с картофелем сорта Bildstar, нежели с картофелем сорта Novano. Это не считается точным. Картофель сорта Novano был довольно неправильной формы, с многочисленными вмятинами,

трещинами и ямками, и поэтому влияние очистки на результат было незначительным, в отличие от картофеля сорта Bildstar с более правильной формой. Для подтверждения того, что очистка имеет аналогичный эффект для любого сорта картофеля, был закуплен картофель Novano (2 × 1 кг), и одна партия была очищена 5 вручную с помощью ножа, с целью убрать все неровности и полностью удалить кожицу и часть мякоти под ней, а также в крутых вмятинах и трещинах. Другую партию картофеля перерабатывали без очистки.

Для проверки влияния очистки определяли содержание золы и калия в очищенном и неочищенном картофеле. Результаты, показанные в таблице 3, 10 подтверждают идею о том, что в случае с клубнеплодами картофеля с большим количеством трещин и вмятин тщательная очистка также снижает количество загрязняющих веществ, которые, по-видимому, присутствуют во внешнем слое. Таким образом, очистка оказывает влияние, описанное в настоящей заявке, для любого сорта картофеля.

15 *Таблица 3. Содержание золы и калия в очищенном и неочищенном картофеле сорта Novano*

		Неочищенный	Очищенный
Содержание белка в сухом веществе	г/кг	778	806
Зола	г/кг белка	91	75
Калий	г/кг белка	41	33

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения изолята белка клубнеплодов, включающий:
 - а) очистку по меньшей мере одного клубнеплода с получением, таким образом, по меньшей мере одного очищенного клубнеплода и композиции очистков клубнеплодов;
 - 5 б) переработку указанного по меньшей мере одного очищенного клубнеплода с получением водной жидкости, содержащей белок клубнеплода;
 - с) направление указанной жидкости на стадию выделения белка с получением указанного изолята белка клубнеплодов.
- 10 2. Способ по п.1, отличающийся тем, что указанная очистка включает механическую очистку и/или паровую очистку.
3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанная переработка с получением водной жидкости включает перетирание, приготовление пюре, измельчение на терке, дробление, прессование или нарезание по

15 меньшей мере одного очищенного клубнеплода и, необязательно объединение с водой.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что указанная переработка дополнительно включает одну или более стадий,

20 выбранных из удаления крахмала, микрофльтрации, флокуляции, диафльтрации, концентрирования, добавления сульфитов, удаления гликоалкалоидов, регулирования уровня pH и/или обработки импульсным электрическим полем.
5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанная стадия

25 выделения белка включает кислотную коагуляцию, тепловую коагуляцию, изоэлектрическое осаждение, комплексообразование, ультрафльтрацию, диафльтрацию, абсорбцию или хроматографию.
6. Способ по любому из пп. 1-5, отличающийся тем, что способ реализуют с получением по меньшей мере 5 кг белка в час.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что указанный клубнеплод представляет собой картофель, сладкий картофель, кассаву, ямс или таро, предпочтительно картофель.
8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный изолят белка клубнеплодов содержит нативный белок клубнеплодов, содержащий изолят ингибитора протеазы клубнеплодов, изолят пататина клубнеплодов или общий изолят клубнеплодов, содержащий смесь ингибитора протеазы и пататина.
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что композицию очистков клубнеплодов подвергают следующим стадиям:
 - а) переработке указанной композиции очистков клубнеплодов с получением вторичной водной жидкости, содержащей белок клубнеплодов;
 - б) направление указанной вторичной водной жидкости на вторую стадию выделения белка с получением вторичного изолята белка клубнеплодов.
10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанная переработка включает одну или более стадий переработки, выбранных из группы, включающей перетирание, приготовление пюре, измельчение на терке, дробление, прессование или нарезание по меньшей мере одного очищенного клубнеплода и, необязательно с добавлением воды, и дополнительно включает одну или более стадий, выбранных из микрофльтрации, флокуляции, диафльтрации, концентрирования, добавления сульфита, удаления гликоалкалоидов, регулирования уровня pH и/или обработки импульсным электрическим полем с получением указанной вторичной водной жидкости.
11. Способ по п. 9 или 10, отличающийся тем, что указанная вторая стадия выделения белка включает кислотную коагуляцию, тепловую коагуляцию, изoeлектрическое осаждение, комплексообразование, ультрафльтрацию, диафльтрацию, абсорбцию или хроматографию и, необязательно, стадию высушивания.

12. Продукт сырого белка клубнеплодов, содержащий менее 30 мг/кг сахаров, выбранных из группы, включающей сахарозу, глюкозу и фруктозу, и менее 1000 мг/кг гликоалкалоидов.
- 5 13. Продукт сырого белка клубнеплодов по п. 12, количество микроорганизмов в котором, определенное путем подсчета общего числа жизнеспособных аэробных микроорганизмов в соответствии с ISO 4833-1/2013, составляет менее 10^4 КОЕ/грамм, предпочтительно менее 10^3 КОЕ/грамм.
- 10 14. Продукт вторичного сырого белка клубнеплодов, содержащий повышенные количества незаменимых аминокислот треонина, лейцина, изолейцина, метионина и фенилаланина по сравнению с продуктом белка клубнеплода, полученным из неочищенных клубнеплодов.