



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0052611

(51)^{2022.01} A23J 3/14

(13) B

(21) 1-2022-07891

(22) 04/05/2021

(86) PCT/AU2021/050409 04/05/2021

(87) WO2021/222976 11/11/2021

(30) 2020901406 04/05/2020 AU

(45) 27/10/2025 451

(43) 27/03/2023 420A

(73) CURTIN UNIVERSITY (AU)

Kent Street, Bentley, Western Australia 6102, Australia

(72) JOHNSON, Stuart (GB); AL-ALI, Hayder Abdulzahra Abdulmahdi (IQ).

(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) PHƯƠNG PHÁP TẠO RA NGUYÊN LIỆU PROTEIN, NGUYÊN LIỆU PROTEIN ĐƯỢC TẠO RA BẰNG PHƯƠNG PHÁP NÀY, CHẾ PHẨM VÀ SẢN PHẨM THỰC PHẨM CHỨA NGUYÊN LIỆU PROTEIN NÀY

(21) 1-2022-07891

(57) Sáng chế nói chung đề cập protein đậu lupin, và cụ thể hơn đề cập đến việc cải biến protein đậu lupin để cải thiện việc sử dụng nó làm nguyên liệu protein, ví dụ trong chế biến thực phẩm. Sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến, phương pháp này bao gồm tạo ra dung dịch protein đậu lupin, cho sóng siêu âm đi qua dung dịch protein đậu lupin theo cách để tạo thành protein đậu lupin được cải biến và thu hồi protein đậu lupin được cải biến. Sáng chế cũng đề xuất nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến, protein đậu lupin được cải biến có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến, trong đó protein đậu lupin được cải biến được tạo thành bằng cách xử lý protein đậu lupin chưa được cải biến bằng sóng siêu âm, cũng như chế phẩm và sản phẩm thực phẩm chứa nguyên liệu protein này.

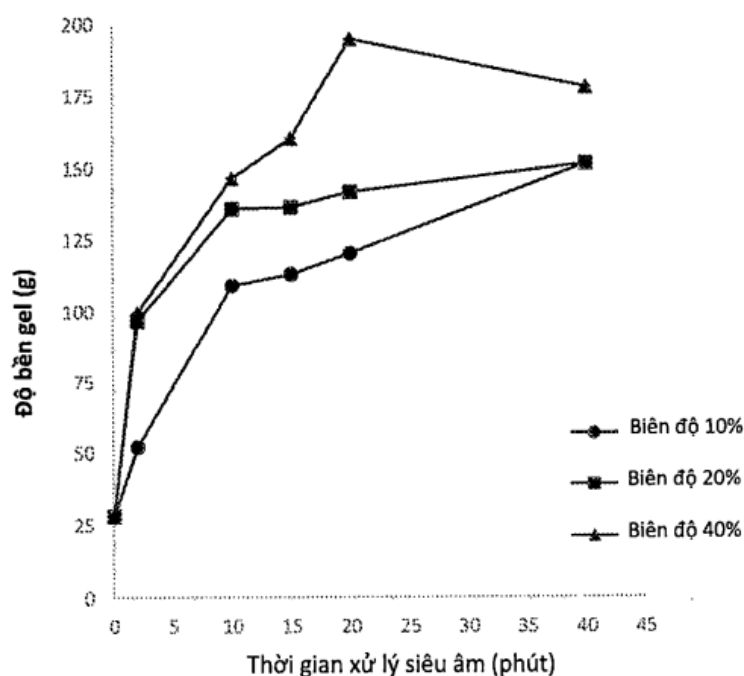


Fig. 2

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế nói chung đề cập protein đậu lupin, và cụ thể hơn đề cập đến việc cải biến protein đậu lupin để cải thiện khả năng chế biến của nó để sử dụng làm nguyên liệu protein, ví dụ trong chế biến thực phẩm.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các thể phân lập protein từ cây họ đậu để sử dụng làm thành phần thực phẩm ngày càng được quan tâm. Các đặc tính giá trị dinh dưỡng và chức năng kỹ thuật thường là các đặc tính quan trọng nhất đối với nguồn protein thực vật bất kỳ để sử dụng làm thành phần thực phẩm. Protein đậu lupin có tiềm năng lớn để thay thế nguồn protein động vật trong ngành công nghiệp thực phẩm chủ đạo do giá trị dinh dưỡng cao và hàm lượng yếu tố kháng dinh dưỡng thấp. Hạt đậu lupin chứa khoảng 40% khối lượng protein với mức cân bằng hợp lý của các axit amin thiết yếu mặc dù có phần nhỏ hơn mức lý tưởng của axit amin chứa lưu huỳnh.

Bất chấp hứa hẹn về protein đậu lupin, nó vẫn chưa được sử dụng đúng mức như một thành phần thực phẩm do thiếu một số chức năng kỹ thuật. Ví dụ, việc thiếu các đặc tính tạo gel ngăn không cho nó được sử dụng trong một số ứng dụng thực phẩm. Gel protein có thể được tạo thành bằng cách gia nhiệt, kết tụ và tạo gel. Ba bước này xảy ra đồng thời trên gel được định hình nóng trong khi bước tạo gel có thể được tách khỏi hai bước trước đó trong hệ gel đã được định hình lạnh bằng cách điều chỉnh điều kiện tạo gel, như nồng độ protein và độ pH, trong trường hợp này các gel tạo thành ở các nhiệt độ (lạnh) thấp hơn là ở các nhiệt độ cao. Gel được định hình lạnh có thể là hữu hiệu trong nhiều ứng dụng như chế biến thực phẩm chứa các thành phần có hoạt tính sinh học nhạy với nhiệt. Gel protein là mạng polyme liên kết ngang, được tạo thành từ các sợi protein chưa gấp nếp và kết tụ. Sự gel hóa protein được xem là

phức tạp do nhiều yếu tố điều khiển quá trình, như loại protein, nồng độ protein, độ pH, cường độ ion và nhiệt độ/thời gian xử lý nhiệt.

Dạng cô đặc/dạng cô lập protein đậu lupin có đặc tính gel hóa cực yếu so với protein động vật và cây họ đậu như protein đậu tương và đậu xanh. Đã báo cáo rằng protein đậu lupin có độ ổn định nhiệt cao hơn độ ổn định nhiệt từ đậu tương do số nhóm disulfua cao. Độ ổn định nhiệt của protein đậu lupin có thể ngăn ngừa nó khỏi bị biến tính và kết tụ, đây là bước gel hóa quyết định trong việc hình thành gel định hình nóng hoặc lạnh. Các đặc tính này của protein đậu lupin khiến cho nó không thích hợp để sử dụng trong công nghiệp chế biến thực phẩm khi cần có các đặc tính giống như gel.

Do không có đặc tính tạo gel mong muốn này, việc sử dụng protein trên cơ sở đậu lupin ít được chú ý đến và sự hình thành gel trên cơ sở đậu lupin và thay vào đó tập trung chú ý đến các nguyên liệu protein và protein có nguồn gốc từ đậu tương. Vì vậy, protein đậu tương đã được biết rất rõ và ngày nay được xem là thị phần lớn đối với protein trên cơ sở thực vật, trong khi protein đậu lupin ít được nghiên cứu.

Vấn đề đối với các nguồn protein trên cơ sở thực vật là ở điều kiện sinh trưởng của thực vật có nghĩa là chúng không thể được trồng ở tất cả các vị trí địa lý, điều này có thể gây ra các vấn đề về an ninh lương thực đối với các quốc gia nhập khẩu ròng protein trên cơ sở thực vật. Đậu tương, chẳng hạn, cần lượng nước lớn hơn so với đậu lupin, vì vậy đậu lupin, không giống như đậu tương thích hợp nhất để sản xuất ở vùng khí hậu Địa Trung Hải.

Cần hiểu rằng, nếu công bố bất kỳ nào về tình trạng kỹ thuật được đề cập tới ở đây, thì việc đề cập này không tạo nên việc thừa nhận rằng công bố đó tạo thành một phần của hiểu biết chung trong tình trạng kỹ thuật của sáng chế, ở Úc hoặc quốc gia bất kỳ nào khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, bản mô tả đề xuất phương pháp tạo thành nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến, phương pháp này bao gồm: tạo ra dung dịch protein đậu

lupin; cho sóng siêu âm cường độ cao đi qua dung dịch protein đậu lupin để tạo thành protein đậu lupin được cải biến theo cách sao cho độ ổn định nhiệt của protein đậu lupin được cải biến giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến; và thu hồi protein đậu lupin được cải biến.

Theo một phương án sáng chế bộc lộ phương pháp tạo thành nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến sao cho có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến, phương pháp này bao gồm: tạo ra dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin, trong đó dịch cô đặc protein đậu lupin này có độ tinh khiết > 65%; cho sóng siêu âm cường độ cao đi qua dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin theo cách để tạo thành protein đậu lupin được cải biến, trong đó dung dịch protein đậu lupin này có độ pH xấp xỉ 7,0 khi được đưa đi xử lý bằng sóng siêu âm; và thu hồi protein đậu lupin được cải biến.

Thuật ngữ “nguyên liệu protein” được hiểu có nghĩa là nguồn protein được sử dụng trong một hoặc nhiều quá trình khác để tạo ra các sản phẩm khác, như trong công nghiệp thực phẩm. Ví dụ, phương pháp này có thể được sử dụng để tạo ra nguồn protein đậu lupin được cải biến được sử dụng để tạo thành gel protein mà được sử dụng, ví dụ, trong sản xuất sản phẩm thay thế thịt hoặc trong các ứng dụng tạo kết cấu thực phẩm.

Protein đậu lupin được cải biến theo một phương án có thể có tỷ lệ tám β tăng so với protein đậu lupin chưa được cải biến.

Sóng siêu âm cường độ cao có thể được tạo ra từ máy tạo sóng siêu âm ở tần số 20kHz với công suất nằm trong khoảng từ khoảng 5W/cm² đến khoảng 50W/cm². Nhiệt độ của dung dịch lupin có thể được duy trì dưới khoảng 35 °C khi xử lý bằng sóng siêu âm cường độ cao. Cần hiểu rõ rằng mặc dù dung dịch với lượng lớn có thể vẫn ở dưới khoảng 35 °C, trong vòng sủi bong bóng nhiệt độ có thể cao hơn đáng kể so với 35 °C.

Dung dịch protein đậu lupin có thể được xử lý bằng sóng siêu âm cường độ cao trong khoảng thời gian 60 phút hoặc ngắn hơn. Dung dịch protein đậu lupin có thể có nồng độ protein khoảng 0,1% (w/w) đến khoảng 40% (w/w), như từ khoảng 5% (w/w)

đến khoảng 20% (w/w) bao gồm các nồng độ như khoảng 10% (w/w). Chất rắn, như protein cô lập tự nhiên thô, mà được sử dụng để tạo thành dung dịch protein đậu lupin có thể có hàm lượng protein đậu lupin >35%. Theo một số phương án, protein đậu lupin được sử dụng để tạo thành dung dịch protein đậu lupin có thể có độ tinh khiết >70%. Theo một số phương án, chất rắn có thể là dạng cô lập protein đậu lupin. Dung dịch protein đậu lupin có thể có độ pH khoảng 7,0, chẳng hạn $7,0 \pm 0,1$, khi được xử lý bằng sóng siêu âm cường độ cao. Theo một phương án, phương pháp này có thể còn bao gồm bước tinh chế để tinh chế dung dịch protein đậu lupin và/hoặc để tinh chế protein đậu lupin được cải biến.

Theo một phương án, sau khi tạo ra protein đậu lupin được cải biến, phương pháp này có thể còn bao gồm: điều chỉnh độ pH của dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến điểm đẳng điện của protein đậu lupin được cải biến; và gia nhiệt dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến nhiệt độ gây ra sự kết tụ của protein đậu lupin được cải biến và sau đó làm lạnh dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến để tạo ra gel.

Protein đậu lupin được cải biến có thể được thu hồi ở dạng gel. Điểm đẳng điện có thể xấp xỉ độ pH 4,5. Dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến có thể gia nhiệt trên 70 °C. Dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến có thể được duy trì ở nhiệt độ gây ra sự kết tụ của lupin được cải biến trong ít hơn 60 phút. Theo một phương án, dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến có thể được duy trì ở nhiệt độ gây ra sự kết tụ của lupin được cải biến trong xấp xỉ 20 phút. Sau khi gia nhiệt dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến nhiệt độ gây ra sự kết tụ của protein đậu lupin được cải biến, dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến có thể được làm lạnh xuống dưới khoảng 70 °C, như làm lạnh đến nhiệt độ trong phòng, để tạo thành gel. Nhiệt độ tối đa đạt được trong quá trình gia nhiệt có thể là xấp xỉ 95 °C. Phương pháp này có thể còn bao gồm bước khử nước gel. Một phương án có thể còn bao gồm bước tạo dung dịch protein đậu lupin được cải biến trước khi điều chỉnh độ pH của dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến điểm đẳng điện của protein đậu lupin được cải biến.

Protein đậu lupin được cải biến có thể được thu hồi ở dạng bột. Protein đậu lupin được cải biến có thể được thu hồi ở dạng thể cô lập protein đậu lupin được cải biến.

Bản mô tả cũng đề xuất nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp như đã nêu ở trên.

Bản mô tả cũng đề xuất nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến, protein đậu lupin được cải biến này có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến. Protein đậu lupin được cải biến được tạo thành bằng cách xử lý dịch cô đặc protein đậu lupin chưa được cải biến có độ tinh khiết > 65% và độ pH xấp xỉ 7,0 bằng sóng siêu âm cường độ cao.

Protein đậu lupin được cải biến có thể có tỷ lệ tám β -tăng so với protein đậu lupin chưa được cải biến. Nguyên liệu protein có thể có độ tinh khiết của protein đậu lupin được cải biến > 35%, như là khoảng >70%. Theo một số phương án độ tinh khiết có thể là >90%. Theo một số phương án, protein đậu lupin được cải biến được đề xuất ở dạng thể cô lập. Nguyên liệu protein có thể ở dạng bột.

Theo một phương án, nguyên liệu protein ở dạng gel. Gel có thể có số Bloom nằm trong khoảng từ khoảng 20 đến khoảng 220. Gel có thể có khả năng giữ nước nằm trong khoảng từ khoảng 20% đến khoảng 75%. Gel có thể là gel định hình lạnh.

Chế phẩm chứa nguyên liệu protein như đã nêu ở trên cũng được bọc lộ.

Sản phẩm thực phẩm chứa nguyên liệu protein như đã nêu ở trên cũng được bọc lộ. Sản phẩm thực phẩm có thể để dùng cho người hoặc động vật bao gồm cả thủy sản.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các phương án của bản mô tả hiện sẽ chỉ được mô tả bằng cách nêu làm ví dụ có tham chiếu đến các hình vẽ không giới hạn sau đây.

Fig. 1 thể hiện mối liên hệ giữa sự axit hóa dung dịch protein đậu lupin 10% (w/w) bằng glucono- δ -lacton (GDL) ở các nồng độ % (w/v) khác nhau.

Fig. 2 thể hiện ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm và công suất siêu âm đến độ bền gel lupin.

Fig. 3 thể hiện ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm và công suất siêu âm đến khả năng giữ nước của gel lupin.

Fig. 4 thể hiện ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm (0-40 phút) ở công suất 38W/cm² đến độ hòa tan dịch cô đặc protein đậu lupin. Các giá trị a, b, c, d, e với các chữ cái khác nhau trong các cột là khác nhau đáng kể ($p \leq 0,05$).

Fig. 5 thể hiện phổ hồng ngoại của dịch cô đặc protein đậu lupin được cải biến và chưa được cải biến từ (a) 1600-1660 cm⁻¹ và (b) 1200-1400 cm⁻¹.

Fig. 6 thể hiện ảnh hưởng của việc xử lý siêu âm đến đặc tính gel hóa của dịch cô đặc protein đậu lupin được gây ra bởi glucono- δ -lacton (GDL) trong quá trình gia nhiệt từ 25 °C đến 95 °C ở tốc độ 2 °C/phút (sự thay đổi nhiệt độ được thể hiện bởi đường thẳng). Hình tròn là các mẫu đối chứng (không được siêu âm) và hình vuông là đã được siêu âm trong 40 phút ở 38W/cm².

Fig. 7 thể hiện ảnh hưởng của việc xử lý siêu âm đến đặc tính gel hóa của dịch cô đặc protein đậu lupin được gây ra bởi GDL trong bước bảo quản nhiệt ở 95 °C ở tốc độ 2°C/phút (việc bảo quản ở nhiệt độ không đổi được chỉ ra bởi đường thẳng). Hình tròn là các mẫu đối chứng (không được siêu âm) và hình vuông là đã được siêu âm trong 40 phút ở 38W/cm².

Fig. 8 thể hiện ảnh hưởng của việc xử lý siêu âm đến đặc tính gel hóa của dịch cô đặc protein đậu lupin được gây ra bởi GDL trong quá trình làm lạnh từ 95 °C đến 25 °C ở tốc độ 2°C/phút (sự thay đổi nhiệt độ được chỉ ra bởi đường thẳng). Hình tròn là các mẫu đối chứng (không được siêu âm) và hình vuông là đã được siêu âm trong 40 phút ở 38W/cm².

Mô tả chi tiết sáng chế

Phương án thứ nhất đề xuất phương pháp tạo thành nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến. Phương pháp này bao gồm bước tạo ra dung dịch protein đậu lupin và cho sóng siêu âm cường độ cao đi qua dung dịch protein đậu lupin

để tạo thành protein đậu lupin được cải biến. Protein đậu lupin được cải biến có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến. Phương pháp này cũng bao gồm bước thu hồi protein đậu lupin được cải biến.

Việc xử lý siêu âm (nghĩa là xử lý bằng sóng siêu âm) đòi hỏi việc sử dụng sóng âm ở trên ngưỡng nghe của người (>16 kHz) và sử dụng hiện tượng sủi bong bóng để thay đổi các phân tử, như kết cấu thành phần thực phẩm, nhờ sự hình thành liên tục của các khoang hơi và các bong bóng trong dung dịch. Khoang hơi và bong bóng tan vỡ sau vài chu trình giải phóng nhiệt độ và áp suất trong vùng tạo khoang. Ngoài ra, việc xử lý siêu âm có thể khiến cho nước tách ra, tạo ra các gốc phản ứng tự do và các ion H^+ và OH^- mà có thể giúp điều biến các nhóm chức R trên các axit amin mà cấu tạo nên protein. Sự hình thành của các gốc phản ứng tự do và các ion H^+ và OH^- cũng có thể giúp tạo thành các liên kết ngang mới, chẳng hạn trong protein hoặc giữa các protein liên kề.

Khi protein hòa tan trong dung dịch được đưa đi xử lý bằng sóng siêu âm, năng lượng cực lớn trong vùng tạo khoang thu được và (các) gốc phản ứng tự do thu được có thể thúc đẩy sự thay đổi rõ rệt cấu trúc protein, mà có thể cải biến cấu trúc protein, và vì vậy cải biến chức năng. Xử lý siêu âm (bằng sóng siêu âm) có thể tạo điều kiện cho việc protein duỗi nếp gấp và để lộ ra các nhóm protein kỵ nước có hoạt tính (chẳng hạn các nhóm axit amin R) để tạo thành protein đậu lupin được cải biến. Việc để lộ các nhóm protein kỵ nước có thể giúp làm giảm mật độ điện tích tổng thể ở bề mặt của protein đậu lupin được cải biến, mà có thể giúp làm giảm lực đẩy giữa các protein liên kề trong dung dịch. Sự giảm lực đẩy có thể giúp thúc đẩy sự hình thành kết tụ và có thể cho phép việc liên kết ngang nội phân tử tốt hơn giữa các protein liên kề. Sự giảm lực đẩy giữa các protein liên kề thường đi kèm sự giảm độ ổn định nhiệt của protein. Việc xử lý siêu âm có thể dẫn đến sự thay đổi cấu trúc bậc hai của protein. Theo một phương án, việc xử lý siêu âm gây ra sự thay đổi cấu trúc xoắn ốc α thành cấu trúc tấm β . Điều này có nghĩa là protein đậu lupin được cải biến tạo ra có thể có tỷ lệ tấm β tăng so với protein đậu lupin chưa được cải biến.

Dung dịch protein đậu lupin có thể có độ pH mà không cho phép protein đậu lupin tạo thành kết tụ trong quá trình xử lý siêu âm. Theo một phương án, độ pH của

dung dịch protein đậu lupin là khoảng $7,0 \pm 0,1$ trong quá trình xử lý siêu âm. Độ pH của dung dịch protein đậu lupin có thể được điều chỉnh ngay trước khi xử lý siêu âm. Độ pH của dung dịch protein đậu lupin có thể được điều chỉnh trong quá trình tạo thành dung dịch protein đậu lupin. Dung dịch protein đậu lupin có thể được bảo quản lạnh đông và được rã đông ngay trước khi xử lý siêu âm. Dung dịch protein đậu lupin có thể được tạo thành bằng cách hoàn nguyên protein đậu lupin đã được sấy khô.

Dung dịch protein đậu lupin có thể có nồng độ của protein đậu lupin nằm trong khoảng từ khoảng 5% (w/w) đến 20% (w/w). Theo một phương án, dung dịch protein đậu lupin có thể có nồng độ bằng khoảng 10% (w/w). Trên thực tế, protein đậu lupin được sử dụng để tạo thành dung dịch protein đậu lupin có thể có độ tinh khiết bất kỳ. Tuy nhiên, thông thường protein đậu lupin sẽ là dịch cô đặc, nghĩa là có độ tinh khiết >35%. Theo một phương án, độ tinh khiết của protein đậu lupin >70%. Theo một phương án, độ tinh khiết của protein đậu lupin >90%. Theo một số phương án, protein đậu lupin có thể được đề xuất ở dạng thể cô lập protein đậu lupin.

Protein đậu lupin có thể được tinh chế trong bước tinh chế trước khi xử lý siêu âm. Ví dụ, dung dịch thô của protein đậu lupin có thể được tạo thành, sau đó được đưa đi tinh chế ngay trước khi xử lý siêu âm. Tuy nhiên, theo một số phương án protein đậu lupin được tinh chế trước khi tạo thành dung dịch protein đậu lupin. Protein đậu lupin được cải biến có thể được tinh chế trong bước tinh chế sau khi xử lý siêu âm. Ví dụ, protein đậu lupin thô có thể được sử dụng để tạo thành dung dịch protein đậu lupin và sau đó sau khi xử lý siêu âm các tạp chất được loại bỏ. Theo một số phương án, bước tinh chế protein đậu lupin được thực hiện cả trước và sau khi xử lý siêu âm. Quá trình tinh chế có thể bao gồm việc sử dụng quá trình hòa tan và kết tủa, ly tâm và siêu ly tâm, siêu lọc, sắc ký loại trừ theo kích thước, sắc ký trao đổi ion, HPLC và/hoặc sắc ký ái lực. Sau khi tinh chế, protein đậu lupin có thể được đông khô.

Việc thu hồi protein đậu lupin được cải biến có thể bao gồm quá trình kết tủa và/hoặc đông khô. Theo một số phương án, việc thu hồi protein đậu lupin được cải biến bao gồm quá trình tinh chế protein đậu lupin được cải biến. Theo một số phương án việc thu hồi protein đậu lupin được cải biến bao gồm sấy thăng hoa và/hoặc sấy

phun. Protein đậu lupin được cải biến có thể được đề xuất ở dạng bột. Theo một số phương án protein đậu lupin được cải biến có các đặc tính theo bảng 1.

Bảng 1. Các đặc tính của protein đậu lupin được cải biến

Mục	Đặc tính
Tiêu chí đặc trưng	Bột màu vàng nhạt
Mùi	Trung bình đến hấp dẫn
Hương	Dễ chịu đến hấp dẫn
Năng lượng	356 kcal trên 100g
Độ ẩm	Tối đa 5,0%
Protein thô (trên cơ sở chất khô N*5,5)	Tối thiểu 68,0%
Chất béo (trên cơ sở chất khô)	Tối đa 11,0%
Chất xơ (trên cơ sở chất khô)	Tối đa 12,0%
Tro (trên cơ sở chất khô)	Tối đa 3,5%
Khả năng tiêu hóa protein	98%
Điểm số amin hiệu chỉnh khả năng tiêu hóa protein	0,53
Độ pH	7,0±0,5
Gluten	Không phát hiện được
Phytoestrogen	Không phát hiện được

Sóng siêu âm cường độ cao có tần số lớn hơn 16 kHz. Theo một phương án, sóng siêu âm có tần số 20kHz. Trong toàn bộ bản mô tả này, thuật ngữ “siêu âm cường độ cao” và “siêu âm” được sử dụng thay cho nhau. Công suất cần thiết của sóng siêu âm có thể phụ thuộc vào tần số của sóng siêu âm và/hoặc khoảng thời gian xử lý siêu âm. Công suất của sóng siêu âm có thể nhỏ hơn khoảng 50W/cm². Theo một phương án, sóng siêu âm cường độ cao có công suất nằm trong khoảng từ khoảng 5W/cm² đến khoảng 50W/cm². Theo một phương án, sóng siêu âm cường độ cao có công suất nằm trong khoảng từ khoảng 10W/cm² đến khoảng 40W/cm², như 11W/cm² đến 38W/cm².

Khoảng thời gian xử lý siêu âm phụ thuộc vào cường độ của sóng siêu âm. Khi sóng siêu âm cường độ cao có công suất nằm trong khoảng từ khoảng $5\text{W}/\text{cm}^2$ đến khoảng $50\text{W}/\text{cm}^2$, dung dịch protein đậu lupin có thể được xử lý sóng siêu âm cường độ cao trong khoảng thời gian 60 phút hoặc ngắn hơn. Ví dụ, khoảng thời gian xử lý siêu âm có thể nhỏ hơn khoảng 40 phút. Theo một số phương án, khoảng thời gian xử lý siêu âm nằm trong khoảng từ khoảng 20 phút đến khoảng 40 phút. Theo một số phương án khoảng thời gian xử lý siêu âm là khoảng 20 phút hoặc ngắn hơn, ví dụ nằm trong khoảng từ khoảng 2 đến khoảng 20 phút.

Trong quá trình xử lý siêu âm nhiệt độ của dung dịch protein đậu lupin được duy trì thấp hơn ngưỡng nhiệt độ trên. Ngưỡng nhiệt độ trên có thể là nhiệt độ cần thiết để tạo ra kết tủa của protein đậu lupin được cải biến. Ngưỡng nhiệt độ trên có thể là khoảng 60°C . Theo một số phương án có thể có lợi khi duy trì nhiệt độ của dung dịch protein đậu lupin thấp hơn ngưỡng nhiệt độ trên trong quá trình xử lý siêu âm. Ví dụ, dung dịch protein đậu lupin có thể được duy trì thấp hơn khoảng 35°C trong quá trình xử lý siêu âm. Việc giữ dung dịch protein đậu lupin ở nhiệt độ càng thấp càng tốt có thể giúp cải thiện quá trình xử lý siêu âm. Theo một số phương án dung dịch protein đậu lupin có thể được giữ ở nhiệt độ cao hơn nhiệt độ lạnh đông trong quá trình xử lý siêu âm. Cần hiểu rõ rằng nhiệt độ của dung dịch protein đậu lupin đề cập đến nhiệt độ khối của dung dịch và hiểu rằng ảnh hưởng của sự tạo khoang và các quá trình tương tự có thể tạo ra các vùng chứa dung dịch protein đậu lupin ở quy mô micro hoặc nano có nhiệt độ cao hơn nhiệt độ ngưỡng trên. Nói chung, nhưng không phải lúc nào cũng vậy, việc xử lý siêu âm khiến cho nhiệt độ của dung dịch tăng. Việc tăng nhiệt độ phụ thuộc vào công suất của sóng siêu âm và khoảng thời gian xử lý. Nhiệt độ của dung dịch protein đậu lupin có thể được điều chỉnh bởi hệ điều chỉnh nhiệt độ. Hệ điều chỉnh nhiệt độ có thể bao gồm tủ lạnh và/hoặc đá.

Sau khi tạo thành protein đậu lupin được cải biến, nó có thể được chuyển hóa thành gel. Việc tạo gel có thể bao gồm điều chỉnh độ pH của dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến điểm đẳng điện của protein đậu lupin được cải biến. Việc tạo gel có thể bao gồm bước bổ sung một hoặc nhiều muối để điều chỉnh cường độ ion của dung dịch protein đậu lupin được cải biến. Việc tạo gel cũng có thể bao gồm bước

gia nhiệt dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến nhiệt độ gây ra sự kết tụ của protein đậu lupin được cải biến và sau đó làm lạnh dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến để tạo thành gel. Nhìn chung, độ pH của dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến được điều chỉnh trước khi gia nhiệt. Tuy nhiên, theo một số phương án, độ pH được điều chỉnh trong hoặc sau khi gia nhiệt. Độ pH có thể được điều chỉnh đến gần điểm đẳng điện của protein đậu lupin được cải biến. Độ pH đẳng điện có thể là khoảng 4,5. Theo một phương án độ pH được điều chỉnh đến từ khoảng 4,0 đến khoảng 5,5. Điểm đẳng điện pH có thể đạt được bằng cách bổ sung axit. Axit này có thể là sản phẩm thủy phân của glucono- δ -lacton (GDL). Axit này có thể là axit gluconic. Sau khi bổ sung axit, dung dịch protein đậu lupin có thể được trộn, ví dụ bằng cách trộn xoáy. Độ bền của gel thu được có thể giảm do độ pH được dịch chuyển ra xa điểm đẳng điện.

Dung dịch protein đậu lupin được cải biến có thể được gia nhiệt đến hoặc trên ngưỡng nhiệt độ thấp hơn. Nhiệt độ ngưỡng thấp hơn có thể là nhiệt độ cần thiết để bắt đầu kết tụ protein đậu lupin được cải biến. Việc bắt đầu kết tụ có thể đi kèm sự gia tăng các mô đun đàn hồi của dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến. Ngưỡng nhiệt độ thấp hơn có thể là khoảng 60 °C. Theo một phương án, dung dịch protein đậu lupin được cải biến có thể được gia nhiệt đến khoảng 75 °C hoặc lớn hơn, như 95 °C. Theo một số phương án dung dịch protein đậu lupin được cải biến có thể gia nhiệt trên khoảng 70 °C. Dung dịch protein đậu lupin được cải biến có thể được gia nhiệt trong hai hoặc nhiều hơn hai bước gia nhiệt, ví dụ ở bước thứ nhất ở tốc độ gia nhiệt thứ nhất và sau đó ở bước thứ hai ở tốc độ gia nhiệt thứ hai. Dung dịch protein đậu lupin được cải biến có thể được giữ ở trên ngưỡng nhiệt độ thấp hơn trong khoảng thời gian mong muốn. Theo một phương án dung dịch protein đậu lupin được cải biến được xử lý ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng 75 °C đến khoảng 95 °C trong thời gian nằm trong khoảng từ khoảng 20 phút đến khoảng 60 phút. Thời gian cần thiết để kết tụ protein đậu lupin được cải biến phụ thuộc vào nhiệt độ mà ở đó dung dịch protein đậu lupin được cải biến được gia nhiệt đến. Nhìn chung, nhiệt độ càng thấp thì thời gian xử lý càng dài, và nhiệt độ càng cao thì thời gian xử lý càng ngắn. Theo một số phương án dung dịch protein đậu lupin được cải biến được gia nhiệt đến nhiệt độ mong muốn

ở trên ngưỡng nhiệt độ thấp hơn và sau đó duy trì ở nhiệt độ mong muốn trong một khoảng thời gian. Dung dịch protein đậu lupin được cải biến có thể được làm lạnh đến dưới ngưỡng nhiệt độ thấp hơn sau khi nó được gia nhiệt đến hoặc trên ngưỡng nhiệt độ thấp hơn để tạo thành gel. Theo một phương án gel là gel định hình lạnh. Dung dịch có thể được làm lạnh đến khoảng nhiệt độ trong phòng chẳng hạn $<30^{\circ}\text{C}$. Dung dịch có thể được duy trì $<30^{\circ}\text{C}$ trong nhiều hơn 60 phút để định hình gel.

Độ bền của gel có thể phụ thuộc vào các điều kiện được sử dụng để tạo thành gel. Các điều kiện thuận lợi cho sự kết tụ protein có xu hướng tạo gel với độ bền cao hơn so với các điều kiện mà không thuận lợi cho việc thúc đẩy sự kết tụ gel. Ví dụ, việc gia nhiệt dung dịch protein đậu lupin được cải biến đến 95°C thay vì 75°C trong cùng một khoảng thời gian có xu hướng làm tăng độ bền của gel thu được. Tuy nhiên, mối quan hệ như vậy không áp dụng trong tất cả các trường hợp. Theo một số phương án, việc điều chỉnh các điều kiện siêu âm có thể ảnh hưởng đến các đặc tính gel tạo thành. Tương tự, việc điều chỉnh độ pH của dung dịch protein đậu lupin được cải biến đến gần với điểm đẳng điện của protein có thể giúp gia tăng sự kết tụ protein. Việc gia tăng thời gian xử lý siêu âm cũng có thể giúp gia tăng tỷ lệ cấu trúc tấm β so với chuỗi xoắn ốc α , mà có thể giúp cải thiện khả năng hình thành kết tụ của protein được cải biến. Sự kết tụ thúc đẩy liên kết ngang giữa các phân tử giữa các protein liền kề. Liên kết ngang có thể bao gồm liên kết cộng hóa trị và liên kết không cộng hóa trị. Độ bền của gel có thể có số Bloom nằm trong khoảng từ khoảng 20 đến khoảng 220.

Khi tạo gel, nồng độ của dung dịch protein đậu lupin được cải biến có thể nằm trong khoảng từ khoảng 5% (w/w) đến khoảng 30% (w/w). Lượng axit cần thiết để đạt đến điểm đẳng điện của protein đậu lupin được cải biến sẽ thay đổi tùy thuộc vào nồng độ của protein đậu lupin được cải biến. Nhìn chung, sự gia tăng nồng độ dẫn đến sự gia tăng độ bền của gel thu được. Sau khi gel được tạo thành, nó có thể được để cân bằng tiếp trong dung dịch trên cơ sở nước. Gel có thể được rửa sau khi tạo thành để loại bỏ các tạp chất bất kỳ và/hoặc protein không gắn kết bất kỳ khỏi mạng gel.

Khả năng giữ nước của các gel phụ thuộc vào độ bền của gel. Khả năng giữ nước (còn được đề cập đến như là hàm lượng nước hoặc hàm lượng nước cân bằng) là số đo lượng nước mà mạng lưới tạo gel có thể hấp thụ. Gel với độ bền cao hơn

thường sẽ có khả năng giữ nước cao hơn so với gel tương đương với độ bền thấp hơn. Khả năng giữ nước của gel được tạo thành từ protein đậu lupin được cải biến có thể nằm trong khoảng từ khoảng 20% đến khoảng 75%. Sự gia tăng nồng độ của protein đậu lupin được cải biến có thể làm tăng khả năng giữ nước.

Điều quan trọng cần lưu ý là nếu không xử lý siêu âm, không thể tạo gel từ protein đậu lupin tự nhiên có các đặc tính được mô tả trong bản mô tả này do độ ổn định nhiệt của protein đậu lupin.

Các đặc tính cần thiết của gel có thể được xác định bằng cách sử dụng gel. Ví dụ, các gel được sử dụng để làm đặc sản phẩm thực phẩm có thể yêu cầu các đặc tính khác với việc sử dụng gel để định hình sản phẩm thực phẩm. Vì vậy, các thông số được sử dụng để điều chỉnh đặc tính gel (ví dụ nồng độ protein đậu lupin được cải biến, thời gian xử lý siêu âm và nhiệt độ gia nhiệt trong quá trình tạo gel) có thể được điều chỉnh để tạo ra gel với độ bền và khả năng giữ nước được đòi hỏi.

Gel có thể được duy trì ở dạng hydrat của nó sau khi tạo thành. Ví dụ, gel có thể được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn để giảm thiểu sự phân giải protein đậu lupin được cải biến, như nhờ thủy phân. Theo một phương án, gel đã ngâm nước được duy trì ở khoảng 4 °C cho đến khi sử dụng. Theo một số phương án, gel được khử nước. Gel đã khử nước có thể được hợp nước lại trước khi sử dụng.

Protein đậu lupin được cải biến đã được thu hồi và/hoặc gel được tạo thành từ protein đậu lupin được cải biến có thể được sử dụng để tạo thành sản phẩm thực phẩm. Ví dụ, gel có thể được sử dụng để tạo thành sản phẩm tương tự thịt hoặc sữa và sản phẩm không chứa gluten. Protein đậu lupin được cải biến có thể tạo ra protein trên cơ sở thực vật có kết cấu mong muốn và có vị ngon. Protein đậu lupin được cải biến có thể được sử dụng ở dạng nguyên liệu protein. Theo một phương án chế phẩm chứa protein đậu lupin được cải biến (chẳng hạn nguyên liệu protein). Theo một phương án sản phẩm thực phẩm chứa protein đậu lupin được cải biến. Theo một phương án, protein đậu lupin được cải biến có thể được sử dụng trong chế biến các sản phẩm dành cho người ăn chay và thuần chay. Theo một phương án, protein đậu lupin được cải biến có thể có khả năng tạo ra mạng lưới ba chiều ổn định để thu được kết cấu mong muốn trong hệ thực phẩm đích nhờ đột ngột gia tăng và khả năng gel hóa.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các phương án giờ sẽ được mô tả có tham chiếu đến các ví dụ không giới hạn.

Ví dụ 1

1.1 Nguyên liệu

Hạt đậu lupin, *Lupinus angustifolius*. Giống Coromup được cung cấp bởi Bộ công nghiệp Cơ bản và Phát triển khu vực (Department of Primary Industries and Regional Development - DPIRD) Tây Úc. Vỏ hạt được loại bỏ bằng cách sử dụng máy tách vỏ hạt (AMAR, India) và sau đó nhân đậu lupin được tách ra khỏi vỏ bằng máy tách chân không (KIMSEED, Australia). Sau đó nhân đậu lupin được đóng gói chân không và giữ ở 4°C cho đến khi sử dụng.

1.2 Phương pháp

1.2.1 Điều chế dịch cô đặc protein đậu lupin

Nhân đậu lupin được ngâm trong nước cất 1:3 (w/v) trong 3h ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi ngâm, tỷ lệ của nhân:nước được điều chỉnh đến 1:10 (w/v) sau đó trộn trong 1 phút ở tốc độ cao bằng cách sử dụng thiết bị trộn Waring (Model 32BL80, USA). Tiếp theo, độ pH của huyền phù đặc nhân đậu lupin được điều chỉnh đến 9 bằng cách sử dụng NaOH 1M. Huyền phù đặc này được đồng hóa ở tốc độ tối đa trong 30 phút bằng cách sử dụng thiết bị đồng hóa Ingenieurburo CAT model R50D (Hamburg, Germany). Mẫu được tách bằng cách ly tâm trong 30 phút ở 2060g ở 4°C bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm Eppendorf (model 5810 R, Hamburg, Germany). Dịch chiết protein nổi phía trên thu được được loại bỏ bằng cách gạn khỏi viên kết dạng sợi. Nhân đậu lupin được ngâm và được chiết lại bằng cách sử dụng nước cất 1:5 (w/v). Tiếp theo, dịch nổi từ hai lần chiết được kết hợp. Độ pH dịch nổi được điều chỉnh đến 4,5 bằng cách sử dụng HCl 1M để gây ra sự kết tủa protein đẳng điện. Tiếp theo, mẫu được ly tâm ở 2060g trong 30 phút ở 4°C để tách kết tủa protein từ dịch nổi. Độ pH của chất kết tủa được điều chỉnh đến $7 \pm 0,1$ bằng cách sử dụng NaOH 1M. Kết tủa đã được trung hòa này của dịch cô đặc protein đậu lupin được làm đông khô bằng cách sử dụng thiết bị đông khô Model ALPHA 1-2 LO (Christ, Osterode am Harz,

Germany) sau đó được đóng gói chân không và được bảo quản ở 4 °C cho đến khi sử dụng.

1.2.2 Điều chế dung dịch cô đặc protein đậu lupin cho các nghiên cứu gel hóa

Thể phân tán dịch cô đặc protein đậu lupin đã được làm đông khô 10% (w/w) được điều chế bằng cách sử dụng nước đã được loại ion và được khuấy trong 2h ở 750 vòng/phút bằng sử dụng thiết bị khuấy MR Hei-Standard (Schwabach, Germany) ở nhiệt độ trong phòng. Huyền phù protein thu được được giữ ở 4 °C qua đêm để hoàn tất việc hydrat hóa protein sau đó độ pH được điều chỉnh lại đến $7 \pm 0,1$ bằng cách sử dụng NaOH 0,1M/HCl trước khi xử lý siêu âm.

1.2.3 Xử lý siêu âm cường độ cao (High-intensity ultrasound - HIU)

Xử lý HIU được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị xử lý siêu âm model VCX 600 (Sonics & Materials Inc, Danbury, USA) với bộ chuyển đổi model CV26 và đầu dò titan. Các mẫu gồm 20 mL dung dịch cô đặc protein đậu lupin (xem phần 1.2.2) được xử lý trong 0, 2, 10, 15, 20 và 40 phút bằng cách sử dụng các biên độ siêu âm khác nhau là 10%, 20% và 40%. Xử lý HIU được thực hiện trong cốc bệse thủy tinh thành kép được lắp với thiết bị làm lạnh để giữ nhiệt độ mẫu dưới 35°C trong quá trình xử lý siêu âm.

1.2.3.1. Xác định công suất siêu âm cường độ cao

Công suất siêu âm được áp dụng được tính toán theo kỹ thuật đo nhiệt lượng. Công suất siêu âm (P) được tính toán theo công thức:

$$P = MC_p (dT/dt)$$

Trong đó P (W) là công suất siêu âm, M là khối lượng mẫu (g), C_p là nhiệt dung riêng của môi trường (kJ/gK) và dT/dt là tốc độ thay đổi nhiệt độ (T) thay đổi theo thời gian (t). Cường độ siêu âm (W/cm^2) là công suất siêu âm (P) / đơn vị diện tích (cm^2) của bề mặt phát xạ.

Cường độ công suất được tính toán là $11W/cm^2$, $17W/cm^2$ và $38W/cm^2$ ở biên độ 10%, 20% và 40% tương ứng.

1.2.4. Xác định lượng glucono- δ -lacton để đạt đến độ pH đích

Độ pH xung quanh 4,5 được đòi hỏi trong quá trình gel hóa định hình lạnh để tạo thành gel ổn định, do độ pH làm giảm lực đẩy giữa các phân tử protein và tạo điều kiện cho việc liên kết ngang giữa các phân tử để tạo ra mạng lưới gel. Chất phụ gia thực phẩm (chất axit hóa) glucono- δ -lacton (GDL) sẽ thủy phân chậm thành axit gluconic và làm giảm độ pH. Để đạt đến độ pH cuối cùng cần thiết là 4,5 trong quá trình gel hóa, lượng GDL cần thiết trước tiên cần được xác định do mức độ axit hóa của nó phụ thuộc vào loại và nồng độ protein. Các lượng khác nhau (0,20, 0,22, 0,25, 0,27, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,75, 0,80, 0,90, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,7, 1,8 và 1,9% (w/v)) của GDL được bổ sung vào các phần phân ước 20g huyền phù dịch cô đặc protein đậu lupin (phần 1.2.2), sau đó xoáy trong 30 giây ở nhiệt độ trong phòng và được bảo quản ở 4 °C trong 24h. Sau đó độ pH được đo ở nhiệt độ trong phòng. Tất cả các phép đo được thực hiện ba lần. Fig. 1 thể hiện giá trị độ pH theo lượng GDL được bổ sung đối với dung dịch protein đậu lupin 10% (w/w).

1.2.5. Sự gel hóa của dung dịch cô đặc protein đậu lupin được cải biến

1.2.5.1. Axit hóa

Lượng bột GDL được đòi hỏi để đạt đến độ pH 4,5 được bổ sung vào 20g dung dịch cô đặc protein đậu lupin được cải biến 10% (w/w) sau các lần xử lý thời gian siêu âm x công suất khác nhau (phần 1.2.3.). Tất cả các mẫu được trộn bằng cách sử dụng thiết bị trộn xoáy trong 20 giây trước khi xử lý nhiệt.

1.2.5.2. Xử lý nhiệt và tạo gel

Dung dịch cô đặc protein đậu lupin được xử lý siêu âm đã được axit hóa được xử lý ở 95°C trong 60 phút để gây ra sự kết tụ protein đậu lupin như là bước tiền gel hóa. Sau khi xử lý nhiệt, dung dịch được làm lạnh đến nhiệt độ trong phòng trong (a) đồ chứa thủy tinh dung tích 50ml có chiều rộng 40mm và chiều cao 52mm để xác định độ bền gel hoặc (b) ống ly tâm dung tích 50ml để đo khả năng giữ nước. Các mẫu được giữ ở 4 °C trong 24h để cho phép các gel đông cứng trước khi phân tích chất lượng gel.

1.2.6 Xác định độ bền của gel

Độ bền của gel được xác định theo các phương pháp đã được công bố (Food Hydrocolloids, 32(2), 303–311; Ultrasonics Sonochemistry, 17(6), 1075–1081). Phân tích độ bền gel được thực hiện ở 5 °C bằng cách sử dụng thiết bị phân tích kết cấu TVT (model 6700, Perten Instruments, Australia) được lắp với cảm biến lực 5kg và đầu dò hình trụ P/0,5 (đường kính 12,7mm). Việc ép gel được thực hiện ở tốc độ 0,5mm/s với lực kích hoạt 5g. Độ bền gel được biểu thị bằng g, và tất cả các thử nghiệm được thực hiện ba lần.

1.2.7 Xác định khả năng giữ nước (WHC)

Sau khi tạo gel, nước chưa gắn kết được loại bỏ bằng cách lộn ngược ống chứa gel. Giấy lọc được sử dụng để loại bỏ nước tự do bất kỳ còn lại trên thành ống nghiệm. Các mẫu gel lupin được ly tâm ở 1811g trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm Eppendorf model 5810R (Hamburg, Germany). Sau khi ly tâm, nước được giải phóng bất kỳ được loại bỏ bằng cách lộn ngược ống nghiệm để rút nước đã được giải phóng ra. Nước còn lại trên thành ống nghiệm được loại bỏ bằng giấy lọc. % WHC được tính toán là chênh lệch hàm lượng nước giữa mẫu đã ly tâm với mẫu gel gốc.

1.2.8 Độ hòa tan protein

Dịch cô đặc protein đậu lupin 2mg/mL (phần 1.2.2) được hòa tan trong dung dịch đệm sulphat độ pH 7. Dịch huyền phù protein đậu lupin này được khuấy trong 2h và sau đó được giữ ở 4°C qua đêm để hoàn tất hydrat hóa. Thực hiện cô đặc protein bằng cách sử dụng kit thử nghiệm protein axit bicinchoninic (Sigma-Aldrich Co. Australia). Huyền phù protein đậu lupin được ly tâm ở 20000g trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng bằng cách sử dụng thiết bị ly tâm Heraeus (model Pico17, Germany). Độ hòa tan protein (%) được tính toán là (nồng độ protein trong phần dịch nổi sau ly tâm/tổng nồng độ protein trước ly tâm) * 100.

1.2.9 Điện thế zeta

Dịch cô đặc protein đậu lupin đã được làm đông khô từ các mẫu nguyên thể (chưa được xử lý) và đã được xử lý siêu âm 2mg/mL được hòa tan trong nước milli-Q ở nhiệt độ trong phòng. Thể phân tán protein đậu lupin được trộn và giữ trong 2h

trước khi phân tích. Điện thế zeta được phân tích bằng cách sử dụng Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument Ltd., Malvern, Worcestershire, UK).

1.2.10 Phân bố cỡ hạt

Cỡ hạt được xác định ngay sau khi dịch đặc protein đậu lupin được phân tán trong nước milli-Q trong 2h ở nồng độ 2mg/mL. Phân bố hạt được theo dõi trong ba lần đọc liên tiếp bằng cách sử dụng thiết bị phân tích tán xạ ánh sáng laze Mastersizer (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd., UK). Cỡ hạt được biểu thị ở dạng trung bình khối lượng bề mặt (surface weighted mean) (D3,2) và trung bình khối lượng thể tích (volume-weighted mean) (D4,3).

1.2.11 Phương pháp đo lưu biến gel Lupin ở biến dạng nhỏ

Thế phân tán protein đậu lupin đã được xử lý siêu âm cường độ cao và protein đậu lupin chưa được xử lý được điều chế như đã mô tả trong phần 1.2.2-1.2.5. Để đạt được độ pH yêu cầu, 1% GDL được trộn với các mẫu 2 phút trước khi thử nghiệm. Các mô đun bảo quản (G') được đo bằng cách sử dụng thiết bị lưu biến ứng suất có kiểm soát TA Instruments AR-G2 (TA Instruments, Leatherhead, UK) được lắp với các tấm song song (đường kính 40 mm và khe hở 1 mm). Các phép đo được thực hiện ở sức căng không đổi 0,05%, mà nó thuộc vùng tuyến tính, và ở tần số 1Hz. Các mẫu được gia nhiệt từ 25 °C đến 95 °C ở tốc độ gia nhiệt 2 °C/phút, giữ ở 95 °C trong 20 phút, và được làm lạnh xuống đến 25 °C ở tốc độ làm lạnh 2 °C/phút. Tất cả các phép đo được thực hiện làm ba lần.

1.2.12 Profile cấu trúc protein đậu lupin

Profile protein đậu lupin được nghiên cứu bằng cách sử dụng SDS-PAGE có sử dụng hiện tượng điện di khử và không khử như được mô tả bởi (Villarino, Jayasena, Coorey, Chakrabarti-Bell, Foley, Fanning & Johnson, 2015; doi:10.1016/j.foodres.2014.11.046). SDS-PAGE khử và không khử được thực hiện để nghiên cứu ảnh hưởng của việc xử lý siêu âm đối với dịch cô đặc protein đậu lupin. 10µg protein đã được cô lập lupin được hòa tan trong 10µL dung dịch đệm mẫu NuPAGE (Invitrogen). Mẫu được bơm vào gel 4-12% Bis-Tris NuPAGE Novex (Invitrogen, Sigma Aldrich. Australia). Dung dịch đệm chạy MES SDS (Invitrogen)

được bổ sung trước khi điện di được thực hiện trong 1h ở 200V. Điện di được ngừng khi dải mẫu đạt 1cm từ đáy gel. 50 ml thuốc nhuộm Bio-Safe Coomassie G-250 (Bio-Rad Laboratories, USA) được sử dụng để nhuộm màu protein. Làm mất màu gel được thực hiện bằng cách ngâm gel trong nước đã được loại ion năm lần. Các dấu chuẩn khối lượng phân tử (chất chuẩn protein Unstained Mark 12, Invitrogen, Sigma Aldrich, Australia) được sử dụng làm chất tham chiếu để xác định khối lượng phân tử phân đoạn protein đậu lupin bằng cách so sánh khoảng cách di chuyển của mỗi phân đoạn với khoảng cách tương đương của dải đánh dấu khối lượng phân tử.

1.2.13 Phép phân tích nhiệt lượng quét vi sai

Phép đo nhiệt lượng quét vi sai (Differential scanning calorimetry - DSC) được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị TA Instruments DSC 2910 (New Castle, USA). Khoảng 5 mg mẫu được cân vào chảo nhôm được đậy kín. Biểu đồ nhiệt dịch cô đặc protein đậu lupin được ghi trong điều kiện tốc độ gia nhiệt 5 °C/phút từ 25 °C đến 160 °C trong môi trường khí quyển chứa nitơ. Thiết bị phân tích DSC đã được hiệu chỉnh bằng indi. Chảo rỗng được dùng làm mẫu tham chiếu. Các số đo được phân tích để xác định nhiệt độ khởi đầu ($T_{\text{khởi đầu}}$), nhiệt độ đỉnh ($T_{\text{đỉnh}}$) và enthalpy biến tính (ΔH) bằng cách sử dụng phần mềm Universal Analysis 2000, phiên bản 4.5A (TA Instruments).

1.2.14 Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

FTIR được sử dụng để nghiên cứu sự thay đổi cấu trúc protein đậu lupin được tạo ra bởi công suất xử lý siêu âm ở 11W/cm², 17W/cm² và 38W/cm² trong 0, 2, 10, 15, 20 và 40 phút. Nồng độ protein đậu lupin được sấy đông khô được phân tích bằng quang phổ kế Thermo Scientific Nicolet iS50 FTIR được kết hợp với bộ phận lấy mẫu thông minh Smart iTR Attenuated Total Reflectance (ATR) (Thermo Scientific, Madison, WI, USA). Phổ FTIR được ghi trong khoảng 4000-400 cm⁻¹ ở độ phân giải phổ là 4cm⁻¹ với việc bổ sung đồng thời của 64 lần quét. Phổ nền được ghi lại từ tinh thể ATR kim cương sạch đối với mỗi mẫu với sự bổ sung đồng thời của 64 lần quét. Xử lý hậu kỳ được thực hiện bằng cách sử dụng OPUS v7.0 (V7.0, Bruker, Ettlingen, Germany), và đường nền phổ FTIR được hiệu chỉnh và vector được chuẩn hóa theo bước sóng bao hàm các vùng phổ Amit I, Amit II, và Amit III.

1.3 Phương pháp phân tích thống kê

Các phép phân tích được thực hiện ba lần trừ khi được chỉ ra theo cách khác. Dữ liệu được phân tích thống kê với phần mềm SPSS vs.21. Phân tích phương sai hai chiều (ANOVA) với khoảng tin cậy 95% được sử dụng để đánh giá mức có nghĩa của kết quả thu được. Dữ liệu ANOVA với $P < 0,5$ được xem là có nghĩa về mặt thống kê.

1.4 Kết quả và bàn luận

1.4.1 Độ bền gel lupin

Độ bền gel là một trong số các thuộc tính chất lượng quan trọng nhất của gel. Ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm và công suất siêu âm đến độ bền gel lupin được chỉ ra trên Fig. 2. Thời gian xử lý siêu âm, công suất siêu âm và tương tác của chúng có ảnh hưởng đáng kể ($p \leq 0,05$) đến độ bền gel protein đậu lupin. Đã nhận ra rằng độ bền gel lupin thay đổi từ 28,33g-195,33g tùy thuộc vào điều kiện xử lý siêu âm. Gel protein đậu lupin nguyên thể mà không xử lý siêu âm có độ bền gel thấp nhất đáng kể ($p \leq 0,05$), trong khi xử lý bằng $38\text{W}/\text{cm}^2$ (40% Amp) có độ bền gel protein đậu lupin cao nhất đáng kể ($p \leq 0,05$) so với $11\text{W}/\text{cm}^2$ (20% Amp) và $17\text{W}/\text{cm}^2$ (10% Amp) tương ứng ở tất cả các lần xử lý. Mặt khác, thời gian xử lý 20 phút ở tất cả công suất siêu âm, cho độ bền gel cao nhất đáng kể so với tất cả các lần xử lý. Theo đó, $38\text{W}/\text{cm}^2$ trong thời gian xử lý 20 phút có độ bền gel được ghi lại cao nhất. Các nghiên cứu trước đây chỉ ra rằng thời gian xử lý siêu âm vừa phải có thể cải thiện độ bền gel bằng cách tạo điều kiện cho việc duỗi nếp gấp protein và để lộ ra các nhóm protein kỵ nước có hoạt tính cho khả năng liên kết ngang nội phân tử tốt hơn ở gel protein đậu tương và whey, mặc dù không nghiên cứu nào về protein đậu lupin được báo cáo (Hu, Cheung, Pan, & Li-Chan, 2015; Shen, Fang, Gao, & Guo, 2017; Shen, Zhao, Guo, Zhao, & Guo, 2017). Ngoài ra, đã báo cáo rằng thời gian xử lý siêu âm tăng đến 40 phút không cải thiện đáng kể gel protein whey so với xử lý nhẹ nhàng trong thời gian 20 phút ở $107\text{W}/\text{cm}^2$. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, gel protein đậu lupin thể hiện độ bền gel cao hơn gel thể cô lập protein đậu tương đã được xử lý siêu âm được báo cáo trong tài liệu này (Hu, Li-Chan, Wan, Tian, & Pan, 2013)). Điều quan trọng cần lưu ý là mặc dù các gel được tạo thành từ protein đậu lupin được cải biến được so sánh với gel protein đậu nành, nhưng sự khác biệt về cấu trúc protein giữa protein đậu lupin và

protein đậu nành chẳng hạn có nghĩa là các phương pháp được sử dụng để tạo thành gel protein đậu nành thường không thể được sử dụng để tạo thành gel protein đậu lupin được cải biến. Ví dụ, các gel ổn định được tạo thành từ protein đậu nành có thể được tạo thành mà không cần xử lý siêu âm, trong khi các gel ổn định được tạo thành từ gel protein đậu lupin không thể.

1.4.2 Khả năng giữ nước của gel từ đậu lupin

Khả năng giữ nước (water holding capacity - WHC) của gel protein đậu lupin nằm trong khoảng từ khoảng 29% - 79% giữa gel protein đậu lupin nguyên thể và được xử lý siêu âm (Fig. 3). Có ảnh hưởng đáng kể ($p \leq 0,05$) của thời gian và công suất xử lý siêu âm. WHC thấp nhất đáng kể ($p \leq 0,05$) ghi được trong nghiên cứu này là đối với gen protein đậu lupin chưa được xử lý. Trong nghiên cứu này, các giá trị thời gian và công suất xử lý siêu âm được áp dụng cao nhất (38W/cm²/20 phút) tạo ra WHC của gel protein đậu lupin ghi được là cao nhất (79%). Công suất siêu âm 38W/cm² có ảnh hưởng tích cực đáng kể nhất đến WHC của gel protein đậu lupin so với hai công suất khác (11W/cm² và 17W/cm²) được sử dụng trong nghiên cứu này. Mặt khác, việc gia tăng thời gian xử lý siêu âm cũng có ý nghĩa tích cực ($p \leq 0,05$) đối với WHC của gel protein đậu lupin. Có thể nhận ra rằng WHC của gel đậu lupin được cải thiện đáng kể ($p \leq 0,05$) do quá trình xử lý siêu âm. Điều này cũng có thể là do việc cải biến cỡ hạt protein và khả năng liên kết ngang bởi quá trình xử lý siêu âm. Việc liên kết ngang như vậy có thể tạo ra nhiều cấu trúc gel đặc và đồng nhất hơn, mà có thể giữ lại được nhiều nước hơn giữa các phân tử protein trong chất nền gel (Hu et al., 2013; Morales, Martínez, Pizones Ruiz-Henestrosa, & Pilosof, 2015; Nazari, Mohammadifar, Shojae-Aliabadi, Feizollahi, & Mirmoghtadaie, 2018; Shen, Fang, et al., 2017). Tuy nhiên, WHC của gel protein đậu lupin nhỏ hơn WHC của gel từ protein đậu tương và whey, điều này có thể là do độ tinh khiết của các mẫu này (thể cô lập) so với mẫu hiện tại (dịch cô đặc) hoặc do độ pH khoảng 4,5 được sử dụng trong nghiên cứu này. Ngoài ra, WHC vừa phải có thể được đòi hỏi đối với hệ gel nhũ tương, mà là thiết yếu trong một số chất nền thực phẩm yêu cầu khả năng gắn kết dầu. Dịch cô đặc protein đậu lupin đã được xử lý siêu âm có thể có tiềm năng sử dụng như nguyên liệu thay thế thành công cho protein động vật trong các loại sản phẩm như vậy.

1.4.3 Độ hòa tan của protein đậu lupin

Độ hòa tan của protein được xác định là hàm lượng protein trong phần dịch nổi sau khi ly tâm ở 20000g. Ảnh hưởng của việc xử lý siêu âm ở $38\text{W}/\text{cm}^2$ trong 0, 2, 10, 15, 20 và 40 phút được chỉ ra trên Fig. 4. Không có sự khác biệt đáng kể ($p \leq 0,05$) về độ hòa tan protein đậu lupin sau khi xử lý siêu âm trong 2 phút và 10 phút so với protein đậu lupin nguyên thể (chưa được xử lý). Việc gia tăng thời gian phơi sáng khi xử lý siêu âm dẫn đến độ hòa tan của protein đậu lupin giảm đáng kể ($p \leq 0,05$) đặc biệt là trong thời gian xử lý 40 phút. Các kết quả này đã được khẳng định bởi phân tích cỡ hạt, chỉ ra rằng việc xử lý siêu âm làm tăng D_{43} protein đậu lupin một cách đáng kể ($p \leq 0,05$) (Bảng 2) sau 40 phút. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng thời gian xử lý siêu âm tăng có thể làm giảm độ hòa tan protein của thể cô lập protein đậu nành và kê do sự hình thành của chất kết tụ protein không tan, ở đó sự hình thành kết tụ protein nhỏ có thể làm tăng cỡ hạt protein dẫn đến sự kết tụ protein dễ hơn và làm giảm độ hòa tan protein.

1.4.4 Cỡ hạt protein đậu lupin

Bảng 2 thể hiện phân bố cỡ hạt (μm) đối với dịch cô đặc protein đậu lupin tự nhiên và dịch cô đặc protein đậu lupin được xử lý siêu âm ($38\text{W}/\text{cm}^2$) ở 20°C . Việc xử lý siêu âm dẫn đến sự gia tăng đáng kể ($p \leq 0,05$) về cỡ hạt (đường kính trung bình theo thể tích (D_{43})). Dịch cô đặc protein đậu lupin được xử lý siêu âm ở $38\text{W}/\text{cm}^2$ trong 40 phút làm tăng cỡ hạt protein đậu lupin D_{43} đến $69,21\mu\text{m}$ so với $28,24\mu\text{m}$ ở dịch cô đặc protein đậu lupin tự nhiên. Hiện tượng tạo khoang gây ra do xử lý siêu âm có ảnh hưởng nghiêm trọng đến việc đuổi nếp gấp protein sau đó là sự kết tụ kỵ nước, tạo ra các hạt protein kết tụ tương đối lớn (Arzeni et al., 2012; Hu et al., 2013; Jambrak, Lelas, Mason, Krešić, & Badanjak, 2009). Mặt khác, việc xử lý siêu âm trong 2 phút làm giảm đáng kể đường kính trung bình theo thể tích D_{43} ($p \leq 0,05$). Protein đậu lupin tự nhiên có cỡ hạt nhỏ hơn thể cô lập protein đậu tương tự nhiên (Berghout, Boom, & van der Goot, 2015; Morales et al., 2015). Mặc dù cỡ hạt protein đậu lupin tăng đáng kể ($p \leq 0,05$) sau khi xử lý siêu âm trong 40 phút, nó vẫn tương đối nhỏ hơn so với cỡ hạt protein đậu tương.

Bảng 2. Cỡ hạt và thể phân tán protein đậu lupin được xử lý siêu âm.

Thời gian xử lý siêu âm (phút)	d(0,1) μm	d(0,5) μm	d(0,9) μm	D (3,2) (μm)	D (4,3) (μm)
0	4,81 $\pm$ 0,81a	16,12 $\pm$ 0,13a	78,43 $\pm$ 34,53a	10,0 $\pm$ 2,58a	28,24 $\pm$ 0,63a
2	1,52 $\pm$ 0,66ab	13,78 $\pm$ 1,7a	44,68 $\pm$ 0,55a	4,85 $\pm$ 0,58a	20,44 $\pm$ 1,9a
10	10,57 $\pm$ 1,71bc	25,74 $\pm$ 4,94ab	62,39 $\pm$ 15,66a	33,82 $\pm$ 7,77ab	19,94 $\pm$ 3,61ab
15	14,87 $\pm$ 3,75c	43,34 $\pm$ 13,24bc	119,56 $\pm$ 37,77b	30,63 $\pm$ 8,36bc	57,42 $\pm$ 17,54bc
20	13,69 $\pm$ 3,44c	34,42 $\pm$ 10,3ab	79,72 $\pm$ 29,32a	26,06 $\pm$ 7,21bc	41,73 $\pm$ 14,04abc
40	17,94 $\pm$ 4,32c	59,35 $\pm$ 12,8c	134,3 $\pm$ 31,34b	38,03 $\pm$ 9,08bc	69,21 $\pm$ 15,8c

Các giá trị a, b, c, d, e với các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau đáng kể ($p \leq 0,05$).

1.4.5 Điện thế zeta

Sự có mặt của nhiều axit amin âm hơn trên bề mặt của các phân tử protein dẫn đến điện thế Z âm của protein này và ngược lại. Các kết quả (Bảng 3) chỉ ra rằng điện thế Z của dịch cô đặc protein đậu lupin tự nhiên giảm nhờ quá trình xử lý siêu âm ở 38W/cm² trong 40 phút từ -26,85 đến -15,48 mV. Việc giảm điện tích âm hạt protein đậu lupin dẫn đến sự giảm lực đẩy giữa các hạt protein, mà nó thúc đẩy sự kết tụ. Hiện tượng này được gây ra bởi sự thay đổi cấu trúc nhờ quá trình xử lý siêu âm mà được xác nhận bởi kết quả cỡ hạt (bảng 2) và kết quả phổ FTIR.

Bảng 3. Đặc tính nhiệt và điện thế zeta của dịch cô đặc protein đậu lupin tự nhiên và được xử lý siêu âm ở 38W/cm² trong 40 phút.

Mẫu	T _{bắt đầu} (°C)	T _{đỉnh} (°C)	ΔH (J/g)	zeta (mV)
Tự nhiên	70,40 $\pm$ 0,24a	104,99 $\pm$ 0,04a	288,28 $\pm$ 0,88a	-26,85 $\pm$ 0,07a
Được xử lý	65,46 $\pm$ 0,31b	102,97 $\pm$ 0,86a	260,70 $\pm$ 0,71b	-15,48 $\pm$ 0,25b

Các giá trị a, b, c, d, e với các chữ cái khác nhau trong cùng một cột là khác nhau đáng kể ($p \leq 0,05$).

1.4.6 Phép phân tích nhiệt lượng quét vi sai

Các đặc tính nhiệt của dịch cô đặc protein đậu lupin bao gồm nhiệt độ bắt đầu

($T_{\text{bắt đầu}}$), nhiệt độ đỉnh ($T_{\text{đỉnh}}$) và enthalpy của sự biến tính (ΔH) đối với protein đậu lupin tự nhiên (protein đậu lupin không được xử lý) và protein đậu lupin được xử lý bằng siêu âm được chỉ ra trong bảng 3. Cả dịch cô đặc protein đậu lupin tự nhiên và được xử lý siêu âm đều thể hiện một đỉnh biến tính thu nhiệt vạch đơn rộng ($T_{\text{đỉnh}}$) ở $104,99^{\circ}\text{C}$ và $102,97^{\circ}\text{C}$ tương ứng. $T_{\text{bắt đầu}}$ và ΔH đối với các mẫu được xử lý siêu âm ($38\text{W}/\text{cm}^2$ trong 40 phút) giảm đáng kể ($p \leq 0,05$) so với các mẫu không được xử lý. Độ ổn định nhiệt protein có liên quan đến độ phức tạp của cấu trúc protein gồm cấu trúc bậc hai và bậc ba, và bất cứ sự thay đổi nào về đặc tính nhiệt protein có thể là do sự thay đổi về cấu trúc hình dạng protein mà tạo điều kiện thuận lợi cho sự biến tính. Kết quả này có thể nhấn mạnh rằng việc xử lý siêu âm làm giảm độ ổn định nhiệt protein đậu lupin do một số thay đổi cấu trúc protein, như gia tăng tỷ lệ tấm β . Sự thay đổi về cấu trúc protein đậu lupin do việc xử lý siêu âm được xác nhận bởi cỡ hạt, zeta và FTIR.

1.4.7 Phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR)

Để nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm và công suất đến cấu trúc protein đậu lupin, các dải amit I, II và III được phân tích bằng cách kiểm tra sự dịch chuyển vị trí đỉnh (xem Fig. 5). Sự hấp thụ trên phổ amit I (Fig. 5a) liên quan đến dao động kéo dài C=O trên khoảng số sóng nằm trong khoảng từ $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$ phổ FTIR đối với cấu trúc bậc hai của protein đậu lupin. Các cấu trúc chuỗi xoắn kép α và tấm β trên phổ amit I có mặt ở số sóng $1662\text{--}1655\text{cm}^{-1}$ và $1272\text{--}1264\text{cm}^{-1}$ tương ứng. Các tín hiệu hấp thụ amit II và III được gán cho dao động kéo dài của C–N và N–H của mạch bên peptit protein trong khoảng $1480\text{--}1575\text{ cm}^{-1}$ và 1200 đến 1400 tương ứng. So sánh phổ FTIR của protein đậu lupin tự nhiên với mẫu được xử lý siêu âm ở $38\text{W}/\text{cm}^2/40$ phút trên dải amit I, cho thấy sự dịch chuyển nhẹ các đỉnh trên số sóng từ 1661 đến 1665cm^{-1} . Điều này có thể liên quan đến sự thay đổi cấu trúc chuỗi xoắn kép α thành cấu trúc tấm β do sự biến tính và sự kết tụ protein mà xác nhận các phát hiện tiềm năng về cỡ hạt và điện thế zeta. Ngoài ra, trong vùng amit I, protein đậu lupin được xử lý bằng siêu âm thể hiện sự gia tăng về độ hấp thụ tín hiệu ở 1618cm^{-1} (Fig. 5a) mà là bằng chứng rõ rệt hơn về sự hình thành cấu trúc tấm β được kết tụ của protein. Fig. 5a thể hiện dịch cô đặc protein đậu lupin được xử lý bằng siêu âm có đỉnh

amit I rộng hơn ở 1635cm^{-1} so với dịch cô đặc protein đậu lupin không được xử lý, mà nó được cho là tạo thành tấm β phản song song. Điều này có thể khẳng định rằng việc xử lý siêu âm tạo điều kiện thuận lợi cho việc duỗi nếp gấp protein và phá vỡ cấu hình của protein đậu lupin. Phổ FTIR trên vùng amit II ở $1530, 1538, 1555$ và 1570 cm^{-1} chỉ ra các đỉnh bị mất sau khi xử lý siêu âm. Mặt khác, phổ FTIR của protein đậu lupin trên vòng amit III giữa $1250\text{-}1230\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 5b) chỉ ra sự tạo thành các đỉnh mới sau khi xử lý siêu âm, điều này có thể là do sự hình thành các kết tụ mới, tạo ra các hạt lớn hơn.

1.4.8 Điện di trên gel natri dodecyl sulfat-polyacrylamit (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis - SDS-PAGE*)

SDS-PAGE của protein đậu lupin thể hiện profile điển hình của các dưới đơn vị protein đậu lupin chính là α conglutin (11S globulin) và β conglutin (7S globulin). So sánh các mẫu điện di của protein đậu lupin tự nhiên với protein đậu lupin được xử lý bằng siêu âm cho thấy không có sự thay đổi chính về mẫu SDS-PAGE protein đậu lupin, điều này gợi ý rằng siêu âm không biến đổi cấu trúc bậc nhất của protein đậu lupin hoặc liên kết ngang di-sulfua giữa các phân tử và gợi ý rằng các liên kết không cộng hóa trị như tương tác tĩnh điện và kỵ nước kiềm chế các kết tụ protein đậu lupin mới được hình thành.

1.4.9 Các đặc tính lưu biến

Thiết bị đo lưu biến ứng suất được điều chỉnh được sử dụng để giám sát sự phát triển cấu trúc protein đậu lupin trong suốt quá trình hình thành gel từ dịch cô đặc protein đậu lupin. Từ Fig. 6, đã quan sát được rằng các mẫu được xử lý siêu âm có mô đun đàn hồi (G') cao hơn mẫu lupin không được xử lý, mà nó chỉ ra khả năng protein đậu lupin tạo thành mạng lưới gel sau khi xử lý siêu âm. Mẫu siêu âm bắt đầu phát triển kết cấu sau 500 giây (40°C), trong khi mẫu không xử lý bắt đầu phát triển kết cấu sau 1750 giây (70°C). Điều này có thể được nhận thấy bằng cách tăng giá trị G' do sự hình thành kết tụ protein, xác nhận rằng việc xử lý siêu âm làm cải biến cấu trúc protein bằng cách làm duỗi một số polypeptit, tạo điều kiện thuận lợi cho các tương tác giữa các phân tử do việc làm giảm độ pH do các sản phẩm thủy phân GDL dẫn đến làm giảm lực tĩnh điện đẩy nhau giữa các protein liên kề trong dịch cô đặc protein đậu

lupin. Việc giữ thể phân tán protein đậu lupin ở 95°C trong 20 phút (Fig. 7) dẫn đến sự gia tăng nhẹ nhưng ổn định của G' đối với các mẫu không xử lý. Mặt khác, các mẫu siêu âm thể hiện sự giảm G' một chút từ 800 Pa đến 700 Pa sau 1000 giây, điều này là do sự xáo trộn liên kết hydro và sự hình thành tương tác kỵ nước. Tuy nhiên, so với mẫu không xử lý, các mẫu được xử lý siêu âm có G' cao hơn đối với cùng một lượng gia nhiệt. Điều này xác nhận rằng việc xử lý siêu âm làm giảm độ ổn định nhiệt protein đậu lupin. Ngay khi làm lạnh (Fig. 8) mẫu được xử lý siêu âm thể hiện giá trị G' cao hơn mẫu không xử lý. Các mẫu được xử lý siêu âm đạt đến giá trị cực đại là 4200 Pa ở 25°C, trong khi mẫu không xử lý đạt giá trị cực đại là 1600Pa ở 25 °C. Các đặc tính của gel được tạo thành từ dịch cô đặc protein đậu lupin đã được xử lý siêu âm thể hiện mạng lưới gel mạnh hơn giống như được hình thành thông qua các nhóm có hoạt tính được bộc lộ mới đây trên mạch bên polypeptit do độ ổn định nhiệt của protein đậu lupin là giảm (chẳng hạn làm tăng tỷ lệ α β). Lưu ý rằng sự thay đổi về cỡ hạt protein đậu lupin, điện thế zeta và DSC sau khi xử lý siêu âm có ảnh hưởng đến các đặc tính độ nhớt đàn hồi của nó. Việc gia tăng cỡ hạt với lực đẩy thấp dẫn đến protein đậu lupin có thể phát triển mạng lưới gel nhanh hơn mẫu lupin không được xử lý. Ngoài ra, độ ổn định nhiệt của protein đậu lupin giảm giúp thúc đẩy các quá trình đuổi nếp gấp và kết tụ của protein nhanh hơn protein đậu lupin tự nhiên

1.5 Kết luận

Việc xử lý siêu âm ở cường độ cao làm thay đổi đáng kể độ bền gel protein đậu lupin, WHC, các đặc tính liên quan đến độ nhớt gel (G') độ hòa tan protein, cỡ hạt và điện thế zeta. Việc siêu âm ở cường độ cao tạo ra cải biến nhỏ đối với cấu trúc bậc hai của protein đậu lupin như được xác nhận bởi quang phổ FTIR. Ngoài ra, việc xử lý siêu âm tạo ra sự giảm các đặc tính nhiệt của protein đậu lupin. Kết quả điện di SDS-PAGE cho thấy không có sự thay đổi đối với khối lượng phân tử của các dưới đơn vị protein đậu lupin chính. Lần đầu tiên đối với lupin, việc xử lý siêu âm ở cường độ cao thể hiện tiềm năng lớn đối với việc cải thiện các thuộc tính chất lượng gel protein đậu lupin (độ bền gel, WHC, độ hòa tan, và các đặc tính độ nhớt (mô đun đàn hồi G')). Việc cải thiện các đặc tính công nghệ-chức năng của đậu lupin ngọt Úc có thể cho phép sử dụng protein đậu lupin làm nguồn protein thực vật trong công nghiệp thực phẩm như

một thành phần thực phẩm, mà nó có thể đáp ứng được yêu cầu của người tiêu dùng về các sản phẩm thay thế thực phẩm lành mạnh và các yêu cầu trong chế biến thực phẩm.

Ví dụ 2

2.1 Vật liệu

Hạt đậu lupin được điều chế theo phần 1.1. trong ví dụ 1.

2.2 Phương pháp

2.2.1 Điều chế dịch cô đặc protein đậu lupin

Dịch cô đặc protein đậu lupin được điều chế theo phần 1.2.1 trong ví dụ 1.

2.2.2 Xác định các yếu tố điều chỉnh khả năng của gel protein đậu lupin bằng cách sử dụng quá trình xử lý siêu âm trong các điều kiện gel định hình lạnh.

Năm yếu tố độc lập với 2^{5-1} thiết kế thí nghiệm thừa số hai mức riêng phần được chọn để xác định ảnh hưởng của chúng đến chất lượng gel để xác định ảnh hưởng của các biến độc lập: thời gian xử lý siêu âm (USt) (phút), cường độ xử lý siêu âm (USI) (W/cm^2), nhiệt độ xử lý nhiệt (TT) ($^{\circ}C$), thời gian xử lý nhiệt (Tt) (phút) và độ pH lên độ bền gel dịch cô đặc protein đậu lupin (g), khả năng giữ nước % và hiệu suất gel (%) bằng cách sử dụng phần mềm Design Expert phiên bản 11. Phần mềm Design Expert được sử dụng để tạo ra các lần chạy thử nghiệm (bảng 4) bằng cách sử dụng các giá trị cực tiểu và giá trị cực đại của các biến độc lập.

Bảng 4 Các biến độc lập thừa số với các giá trị thực tế và được mã hóa

Yếu tố	Biến độc lập	Đơn vị	Giá trị thực		Giá trị được mã hóa	
			Tối thiểu	Tối đa	Tối thiểu	Tối đa
A	Thời gian xử lý siêu âm (USt)	phút	2	20	-1	1,0
B	Công suất xử lý siêu âm (USp)	W/cm^2	11	38	-1	+1
C	Nhiệt độ xử lý nhiệt (TT)	$^{\circ}C$	75	95	-1	+1

D	Thời gian xử lý nhiệt (Tt)	phút	20	60	-1	+1
E	Độ pH	Độ pH	4,5	5,5	-1	+1

2.2.3 Điều chế gel protein đậu lupin

Dung dịch protein đậu lupin 10% (w/w) được điều chế theo phần 1.2.2. trong ví dụ 1. Thể phân tán dịch cô đặc protein đậu lupin 10% (w/w) được điều chế bằng cách sử dụng nước đã được loại ion và được khuấy trong 1h ở nhiệt độ trong phòng. Tiếp theo, dung dịch protein được giữ ở 4 °C qua đêm để hoàn tất việc hydrat hóa protein. Độ pH được điều chỉnh đến 7+/- 0,1 bằng cách sử dụng 0,1M NaOH hoặc HCl trước khi xử lý siêu âm ở cường độ cao.

2.2.4 Xử lý siêu âm ở cường độ cao

Việc xử lý siêu âm ở cường độ cao được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị xử lý siêu âm model VCX 600 (Sonics & Materials Inc, USA) với bộ chuyển đổi model CV26 và đầu dò titan 13mm để siêu âm 20 ml dung dịch từ dịch cô đặc protein đậu lupin 10% (w/w) trong 2 phút hoặc 20 phút tùy thuộc vào giới hạn chạy. Dung dịch từ dịch cô đặc protein đậu lupin được siêu âm trong cốc bệse thủy tinh thành kép được lắp với thiết bị làm lạnh để giữ nhiệt độ mẫu dưới 35°C trong quá trình xử lý siêu âm. Sau khi xử lý siêu âm mẫu được chuyển đến đồ chứa thủy tinh dung tích 60ml có đường kính 40mm. Công suất và cường độ của quá trình xử lý siêu âm là 11W/cm², 17W/cm² và 38W/cm² ở biên độ 10%, 20% và 40%, tương ứng, như được mô tả trong phần 1.2.3.1 trong ví dụ

2.2.5 Nghiên cứu bổ sung glucono-δ-lacton (GDL)

0,5% hoặc 1% (w/v) GDL được bổ sung vào thể phân tán dịch cô đặc protein đậu lupin để thu được độ pH cuối bằng khoảng 5,5 và 4,5 tương ứng.

2.2.6 Sự gel hóa gây ra bởi axit

Lượng bột GDL cần thiết được bổ sung 2 phút trước khi xử lý nhiệt (phần 2.2.7). GDL sẽ thủy phân chậm thành axit gluconic và làm giảm độ pH đến giá trị yêu

cầu tùy thuộc vào giới hạn chạy. Tất cả các mẫu được trộn trước khi xử lý nhiệt bằng cách sử dụng thiết bị trộn xoáy.

2.2.7 Xử lý nhiệt

Dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin đã được siêu âm (đã được cải biến) được xử lý ở 75 °C hoặc 95 °C trong 20 phút hoặc 60 phút (Bảng 4). Sau khi gia nhiệt, dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin đã được cải biến được làm lạnh đến nhiệt độ trong phòng để tạo ra gel, sau đó được giữ ở 4 °C trong 24h để gel cân bằng trước khi phân tích.

2.2.8 Xác định độ bền gel lupin

Độ bền gel được xác định theo phần 1.2.6 trong ví dụ 1.

2.2.9 Xác định khả năng giữ nước (WHC)

Thử nghiệm WHC được tiến hành theo phần 1.2.7 trong ví dụ 1.

2.2.10 Xác định hiệu suất gel

Sau khi gel lupin được tạo thành, lượng nước tự do không gắn kết được loại bỏ cẩn thận bằng cách cho giấy lọc tiếp xúc với lượng nước tự do không gắn kết cẩn thận để không loại bỏ nước khỏi gel. Hiệu suất gel là chênh lệch giữa khối lượng mẫu gel sạch (sau khi loại bỏ nước tự do) với khối lượng mẫu ban đầu. Các mẫu gel được cân chính xác sau khi loại bỏ nước tự do. Hiệu suất gel được tính toán theo phương trình dưới đây:

$$\text{Hiệu suất gel} = (W_g/W_t) * 100$$

Trong đó W_g là khối lượng mẫu gel tính bằng gam sau khi loại bỏ nước không gắn kết và W_t là khối lượng tính bằng gam của dung dịch protein đậu lupin được cải biến gốc bao gồm cả khối lượng của GDL được bổ sung.

2.3 Phương pháp phân tích thống kê

Tất cả các kết quả được biểu thị ở dạng giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Phần mềm chuyên gia thiết kế (V11) (Minneapolis, USA) được sử dụng để tạo ra mô hình và phân tích kết quả (Montgomery, 2017). Thử nghiệm phương sai một yếu tố - One-

way ANOVA và thử nghiệm Tukey được sử dụng để so sánh kết quả trên từng kết quả của biến phụ thuộc. Mỗi tương quan Pearson giữa các yếu tố phụ thuộc được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp thống kê SPSS (V23, SPSS Inc., Chicago, Illinois, US).

2.4 Kết quả và bàn luận

2.4.1 Ảnh hưởng của các biến độc lập lên độ bền gel protein đậu lupin

Độ bền gel là một đặc tính quan trọng nhất của gel để sử dụng làm nguyên liệu ăn được. Độ bền gel từ dịch cô đặc protein đậu lupin nằm trong khoảng từ 11g-215g (Bảng 5) tùy thuộc vào các điều kiện được sử dụng để tạo thành gel. Mô hình này chỉ ra rằng, độ bền gel bị ảnh hưởng đáng kể ($p \leq 0,05$) bởi TT, USt và USp (Bảng 3). Ngoài ra, Tt thể hiện tác dụng tích cực đối với độ bền gel lupin nhưng không đáng kể ($p \leq 0,05$). Đã báo cáo rằng USt ≤ 20 phút Ust có thể cải thiện độ bền gel do sự biến tính protein và sự phơi sáng của các nhóm protein có hoạt tính mà nó cải thiện khả năng tạo thành các liên kết ngang giữa các phân tử ở protein đậu tương và gel protein whey, điều này là phù hợp với kết quả hiện thời. Ngược lại, USt kéo dài $\geq (40$ phút) có ảnh hưởng tiêu cực đến độ bền gel protein đậu tương. Tuy nhiên, gel protein đậu lupin thể hiện độ bền gel cao hơn các gel được tạo thành từ thể cô lập protein đậu tương sau khi xử lý siêu âm ($\sim 50,9$ g). Phân tích nhân tố chỉ ra rằng độ pH có ảnh hưởng tiêu cực đến độ bền gel lupin. Đã báo cáo rằng việc giảm độ pH đến điểm gần điểm đẳng điện sẽ làm tăng độ bền gel do sự giảm lực đẩy và sự gia tăng kết tụ protein. Tuy nhiên, ảnh hưởng của độ pH là không đáng kể ($p \leq 0,05$) đối với ví dụ hiện thời. Chưa có nghiên cứu nào tập trung vào đặc tính gel hóa lupin trong quá trình xử lý gel định hình lạnh và/hoặc xử lý siêu âm để protein đậu tương cô lập và protein whey được sử dụng làm mẫu tham chiếu so sánh.

2.5 Ảnh hưởng của các biến độc lập đối với khả năng giữ nước (WHC) và hiệu suất gel của gel protein đậu lupin

Xử lý siêu âm giúp cải thiện đáng kể WHC của gel lupin ($p \leq 0,05$), xem bảng 5. Phân tích nhân tố ANOVA chỉ ra rằng WHC của gel lupin chịu ảnh hưởng bởi USt, USp và TT (Bảng 5). Các kết quả này phù hợp với các kết quả từ thể cô lập protein

đậu tương, đậu xanh và whey sau khi xử lý siêu âm. Đã báo cáo rằng việc xử lý siêu âm trong 20 phút cải thiện đáng kể WHC của protein đậu lupin nhưng việc tăng thời gian xử lý siêu âm đến 40 phút không giúp cải thiện WHC của protein whey. Ngược lại, việc tăng USt trong nhiều hơn 20 phút làm giảm WHC của gel protein đậu lupin. Việc cải biến cấu trúc protein, cỡ hạt protein, tạo điều kiện cho việc duỗi nếp gấp protein, và để lộ ra các nhóm kỵ nước, có thể tạo ra mạng lưới gel liên kết ngang chặt chẽ vì vậy cải thiện WHC. Ngoài ra, việc giảm lực đẩy bằng cách giảm độ pH giúp tạo ra mạng lưới protein dày đặc hơn nhờ sự tạo thành các tương tác kỵ nước, mà có thể bắt nước (Kohyama, Sano, & Doi, 1995; Puppo, Lupano, & Añón, 1995). Tương quan Pearson chứng tỏ có mối liên hệ tích cực rõ rệt ($R=0,799^{**}$, $P=0,01$) giữa độ bền gel và khả năng giữ nước. Mạng lưới gel mạnh và chắc có thể bắt nhiều nước hơn do cấu trúc bền ngay cả khi ly tâm mạnh so với mạng lưới gel yếu.

Bảng 5 Các yếu tố độc lập và phụ thuộc với các giá trị thực của chúng trong thiết kế thử nghiệm nhân tố.

Chạy	Giá trị thực của các biến					Các yếu tố đáp ứng			
	A	B	C	D	E	Độ bền gel	WHC	Hiệu suất gel	
	phút	W/cm ²	°C	thời gian	Độ pH	g	%	%	
1	20	38	95	20	4,5	215,00±5,66k	71,71±0,12j	97,29±0,12b	
2	20	38	95	60	5,5	210,67±4,24k	61,63±0,69i	96,96±0,06b	
3	2	11	95	20	4,5	29,00±1,41bc	50,93±0,18efg	96,66±0,18b	
4	2	11	95	60	5,5	50,33±4,24e	50,35±0,77efg	96,08±0,69b	
5	20	10	75	20	4,5	39,67±2,83d	43,69±0,14cde	95,66±0,33b	
6	20	38	75	20	5,5	37,33±2,12cd	43,7±0,8cde	96,79±0,54b	

7	2	38	75	60	5,5	25,67±1,41b	42,39±1,13cd	93,34±0,7b
8	2	38	95	20	5,5	82,67±2,12h	52,65±1,14fgh	97,45±0,5b
9	20	11	95	20	5,5	170,67±0,71j	58,39±1,52hi	97,16±0,8b
10	20	11	95	60	4,5	119,67±2,12i	50,08±1,04efg	94,17±0,96b
11	2	11	75	60	4,5	24,00±0,71b	37,24±0,86bc	96,91±0,86b
12	2	38	95	60	4,5	66,00±1,41g	55,72±0,97ghi	85,21±0,41a
13	2	11	75	20	5,5	11,00±1,41a	22,21±0,38a	84,04±0,32a
14	20	38	75	60	4,5	60,67±1,41fg	53,44±1,1fgh	97,36±0,47b
15	2	38	75	20	4,5	24,00±1,41b	30,04±1,12b	97,69±0,25b
16	20	11	75	60	5,5	56,00±2,12ef	47,48±1,34def	97,33±0,7b

Các giá trị trung bình với các chữ cái khác nhau trong cùng một cột chỉ ra chênh lệch có nghĩa ($P < 0,05$).

Hiệu suất gel của dịch cô đặc protein đậu lupin được cải biến đã được cải thiện đáng kể ($p \leq 0,05$) sau khi xử lý siêu âm. Hiệu suất gel tối đa thuộc lần chạy 1 (bảng 5) ở 97,17% cao hơn đáng kể so với 84,6% ở lần chạy 13 (bảng 5). Phân tích nhân tố chỉ ra rằng USt là yếu tố quan trọng nhất ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp gel từ dịch cô đặc protein đậu lupin (bảng 5). Kết quả này có thể là do sự thay đổi cỡ hạt protein và cấu trúc hình dạng protein (Arzeni et al., 2012; Hu et al., 2015; Jambrak et al., 2009). Ngoài ra, mô hình phân tích nhân tố chỉ ra rằng việc gia tăng giá trị độ pH ảnh hưởng tiêu cực đến hiệu suất gel, do khi độ pH ở xa điểm đẳng điện, lực đẩy cao dẫn đến tổn thất trong mạng lưới gel và cuối cùng là mất nước. Tuy nhiên, phân tích ANOVA chỉ ra rằng ảnh hưởng của pH độ là không đáng kể đối với ví dụ hiện thời. Phân tích tương quan Pearson cho thấy tương tác tích cực nhưng không đáng kể ($R=0,264$, $P=0,05$) và ($R=0,341$, $P=0,05$) giữa [hiệu suất gel]:[độ bền gel], và [hiệu suất gel]:[WHC], tương ứng. Sự kết hợp nước từ mạng lưới gel protein đậu lupin chủ yếu phụ thuộc vào khả

năng protein gắn kết các phân tử nước thông qua các tương tác kỵ nước như các liên kết hydro. Tuy nhiên, mạng lưới gel protein đậu lupin thể hiện hiệu suất gel có thể so sánh được với hiệu suất gel từ protein đậu tương và whey.

Bảng 5 Phân tích ANOVA đối với mô hình thừa số riêng phần về sự thay đổi tăng dần của mỗi đáp ứng. Mẫu trắng chỉ ra kết quả không đáng kể.

Đáp ứng	Mô hình	USt	USp	TT	Tt	Độ pH
Độ bền gel	F	46,32	80,97	10,70	100,76	
	P	<0,0001	<0,0001	0,0084	<0,0001	
WHC	F	16,21	13,79	4,56	30,27	
	P	0,0002	0,0030	0,0541	0,0001	
Hiệu suất gel	F	24,53	26,85			
	P	<0,0001	0,0008			

2.3 Kết luận

Phân tích thừa số được sử dụng để khảo sát ảnh hưởng của thời gian xử lý siêu âm (USt) (phút), công suất xử lý siêu âm (USp) (W/cm^2), nhiệt độ xử lý nhiệt (TT) ($^{\circ}\text{C}$), thời gian xử lý nhiệt (Tt) (phút) và độ pH đến độ bền gel protein đậu lupin, khả năng giữ nước và hiệu suất gel. Mô hình chỉ ra rằng các đặc tính gel protein đậu lupin chịu ảnh hưởng đáng kể bởi tác dụng của các biến độc lập USt, USp và TT.

Trong các yêu cầu bảo hộ sau đây và trong phần mô tả trên đây, ngoại trừ ở nơi mà ngữ cảnh yêu cầu, hoặc theo cách khác, để thể hiện ngôn ngữ hoặc ám chỉ cần thiết, từ “bao gồm” hoặc các biến thể như “gồm” hoặc “gồm có” được sử dụng theo nghĩa không loại trừ, tức là để chỉ rõ sự có mặt của dấu hiệu được tuyên bố nhưng không loại trừ sự có mặt hoặc việc bổ sung của các dấu hiệu khác trong các phương án khác.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực hiểu rõ rằng nhiều cải biến có thể được tạo ra mà không đi chệch khỏi tinh thần và phạm vi của sáng chế.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp tạo ra nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến, phương pháp này bao gồm:

tạo ra dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin, trong đó dịch cô đặc protein đậu lupin này có độ tinh khiết $> 65\%$;

cho sóng siêu âm cường độ cao đi qua dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin theo cách để tạo thành protein đậu lupin được cải biến, trong đó dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin này có độ pH xấp xỉ 7,0 khi được đưa đi xử lý bằng sóng siêu âm; và

thu hồi protein đậu lupin được cải biến.

2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó protein đậu lupin được cải biến có tỷ lệ tám β tăng so với protein đậu lupin chưa được cải biến.

3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó sóng siêu âm cường độ cao có tần số 20kHz và công suất nằm trong khoảng từ khoảng $5\text{W}/\text{cm}^2$ đến khoảng $50\text{W}/\text{cm}^2$.

4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó nhiệt độ của dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin được duy trì dưới khoảng 35°C khi được đưa đi xử lý bằng sóng siêu âm cường độ cao.

5. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin được đưa đi xử lý bằng sóng siêu âm cường độ cao trong khoảng thời gian 60 phút hoặc ngắn hơn.

6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin có nồng độ protein bằng khoảng 10% (w/w).

7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, còn bao gồm bước tinh chế để tinh chế dung dịch chứa dịch cô đặc protein đậu lupin và/hoặc để tinh chế protein đậu lupin được cải biến.

8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó sau khi tạo thành protein đậu lupin được cải biến, phương pháp này còn bao gồm:

điều chỉnh độ pH của dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến điểm đẳng điện của protein đậu lupin được cải biến; và

gia nhiệt dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến nhiệt độ gây ra sự kết tụ của protein đậu lupin được cải biến và sau đó làm lạnh dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến để tạo ra gel.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó điểm đẳng điện xấp xỉ độ pH 4,5.

10. Phương pháp theo điểm 8 hoặc 9, trong đó dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến được gia nhiệt trên 70 °C.

11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 10, trong đó dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến được duy trì ở nhiệt độ gây ra sự kết tụ của lupin được cải biến trong 60 phút hoặc ngắn hơn.

12. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 11, trong đó, sau khi gia nhiệt dung dịch chứa lupin được cải biến đến nhiệt độ gây ra sự kết tụ, dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến được làm lạnh đến nhiệt độ trong phòng để tạo thành gel.

13. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 8 đến 12, còn bao gồm bước tạo dung dịch protein đậu lupin được cải biến trước khi điều chỉnh độ pH của dung dịch chứa protein đậu lupin được cải biến đến điểm đẳng điện của protein đậu lupin được cải biến.

14. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó protein đậu lupin được cải biến được thu hồi ở dạng bột.

15. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó protein đậu lupin được cải biến được thu hồi ở dạng thể cô lập protein đậu lupin được cải biến.

16. Nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

17. Nguyên liệu protein chứa protein đậu lupin đã được cải biến, protein đậu lupin được cải biến có độ ổn định nhiệt giảm so với protein đậu lupin chưa được cải biến, trong đó protein đậu lupin được cải biến được tạo thành bằng cách đưa dịch cô đặc

protein đậu lupin chưa được cải biến có độ tinh khiết > 65% và độ pH xấp xỉ 7,0 đi xử lý bằng sóng siêu âm cường độ cao.

18. Nguyên liệu protein theo điểm 17, trong đó protein đậu lupin được cải biến có tỷ lệ tám β tăng so với protein đậu lupin chưa được cải biến.

19. Nguyên liệu protein theo điểm 17 hoặc 18, trong đó độ tinh khiết >70%.

20. Nguyên liệu protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 19, trong đó protein đậu lupin được cải biến là thể cô lập.

21. Nguyên liệu protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 20, trong đó nguyên liệu protein ở dạng bột.

22. Nguyên liệu protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 17 đến 10, trong đó nguyên liệu protein ở dạng gel.

23. Nguyên liệu protein theo điểm 22, trong đó gel có số Bloom nằm trong khoảng từ khoảng 20 đến khoảng 220.

24. Nguyên liệu protein theo điểm 22 hoặc 23, trong đó gel có khả năng giữ nước nằm trong khoảng từ khoảng 20% đến khoảng 75%.

25. Nguyên liệu protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 22 đến 24, trong đó gel là gel định hình lạnh.

26. Chế phẩm chứa nguyên liệu protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 25.

27. Sản phẩm thực phẩm chứa nguyên liệu protein theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 16 đến 25.

1/5

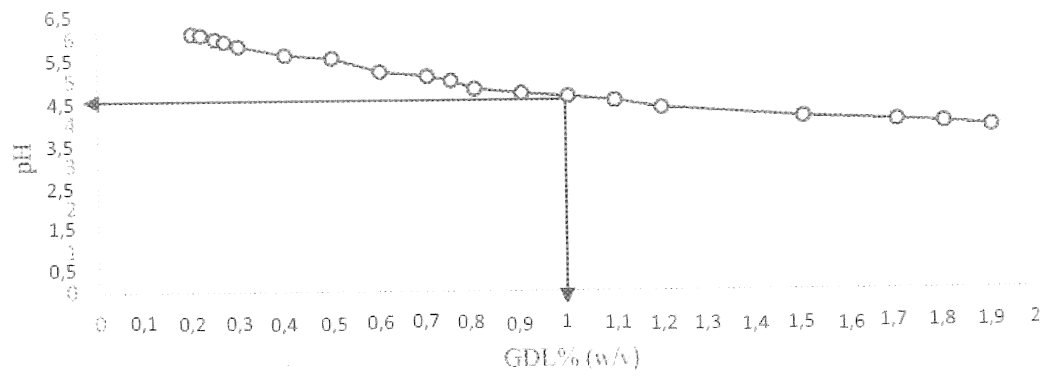


Fig. 1

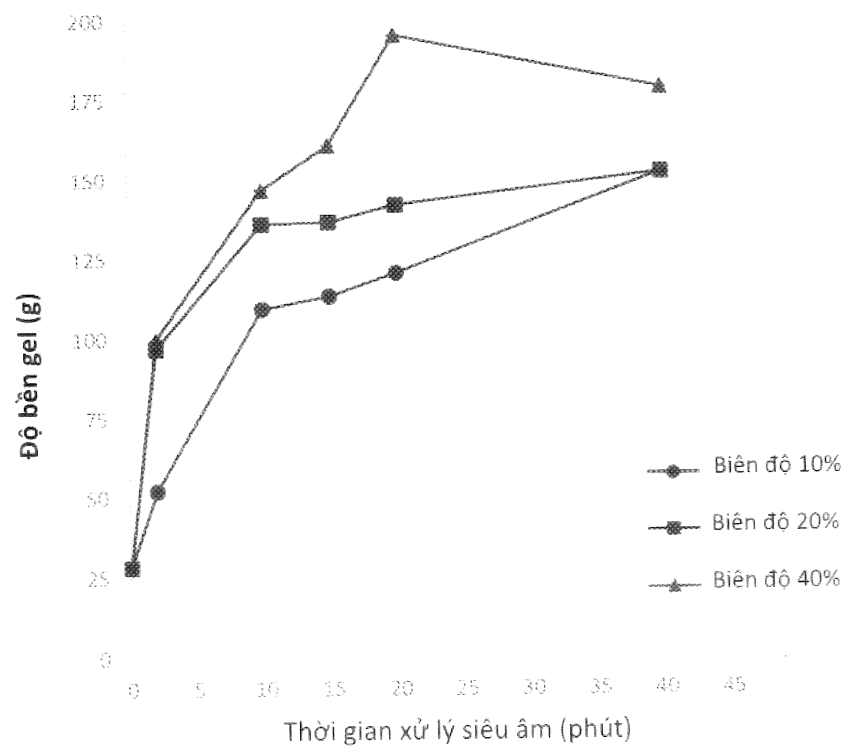


Fig. 2

2/5

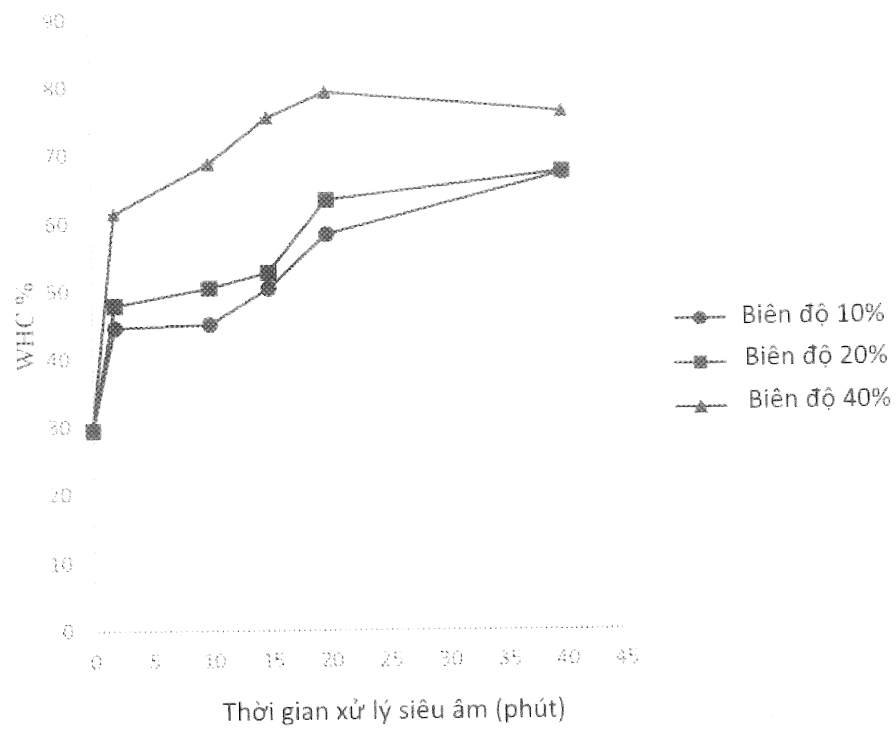


Fig. 3

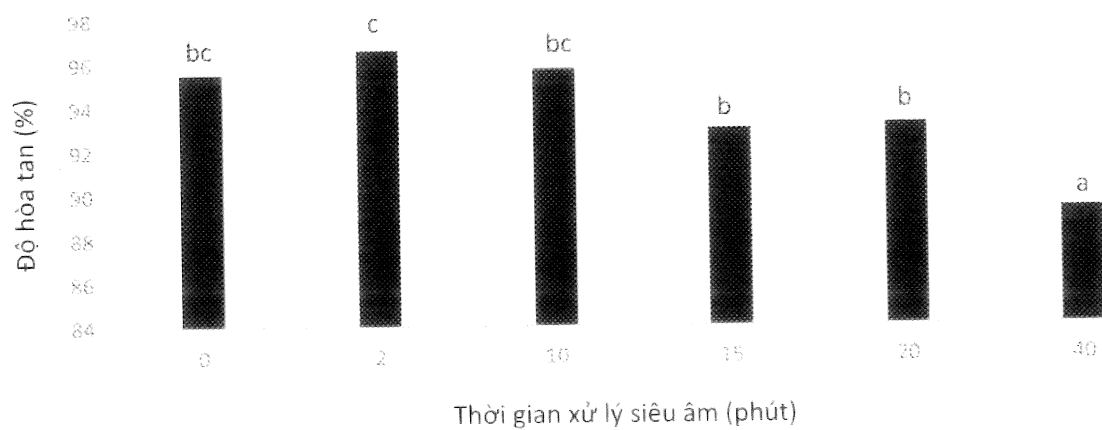


Fig. 4

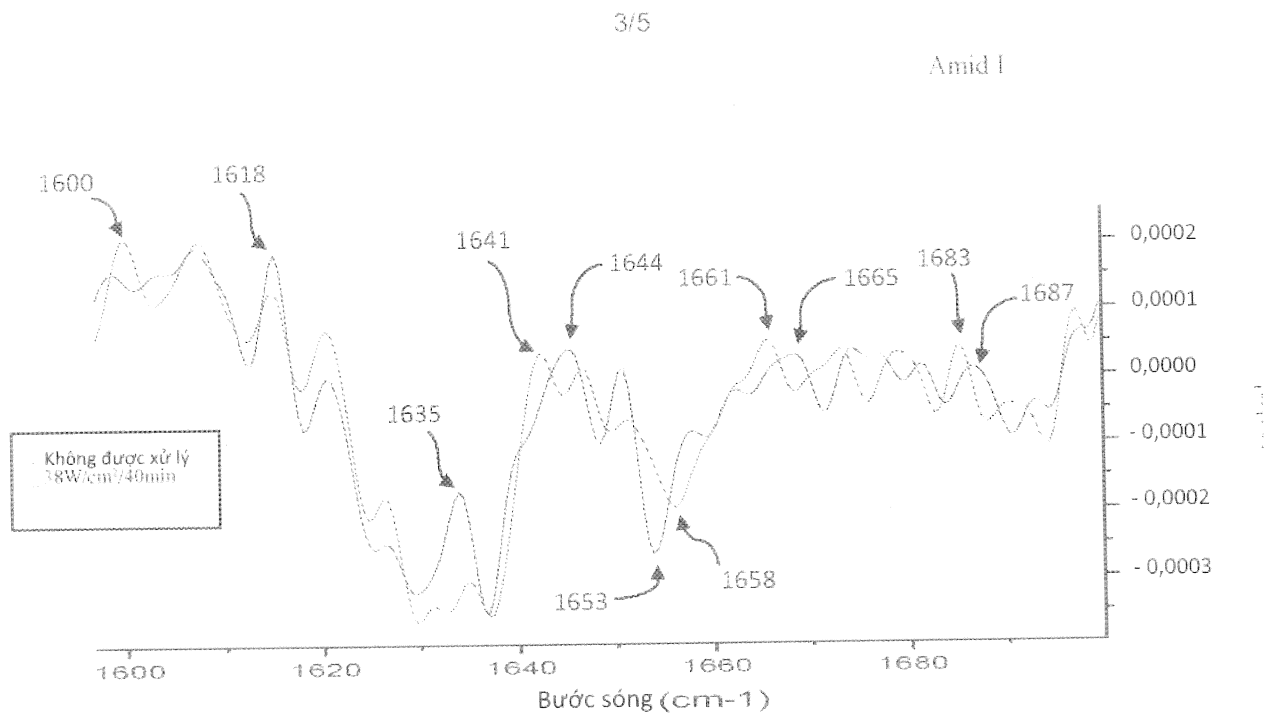


Fig. 5a

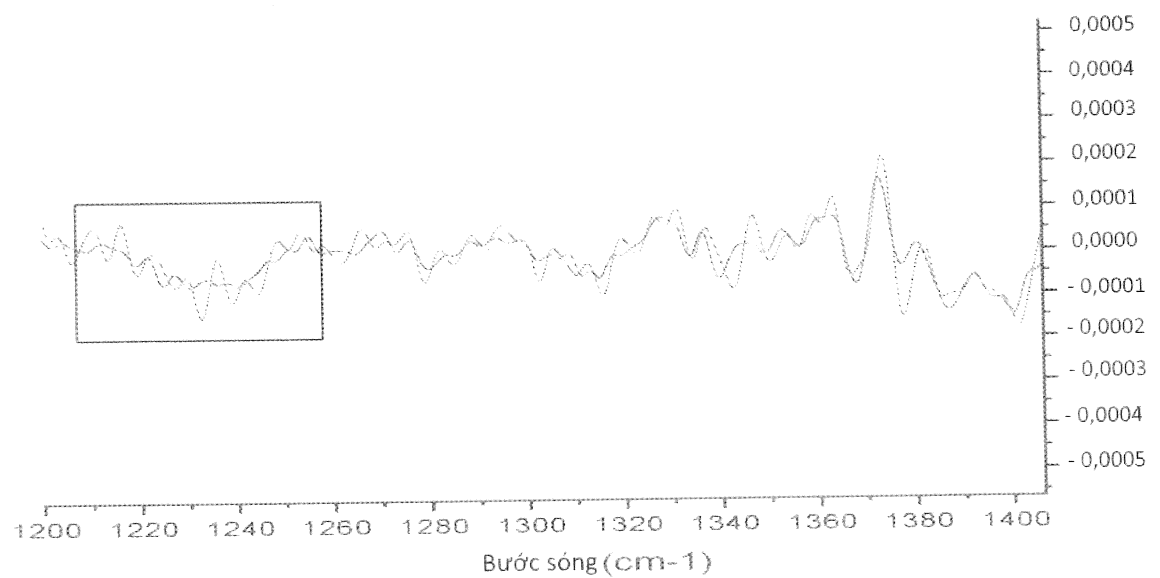


Fig. 5b

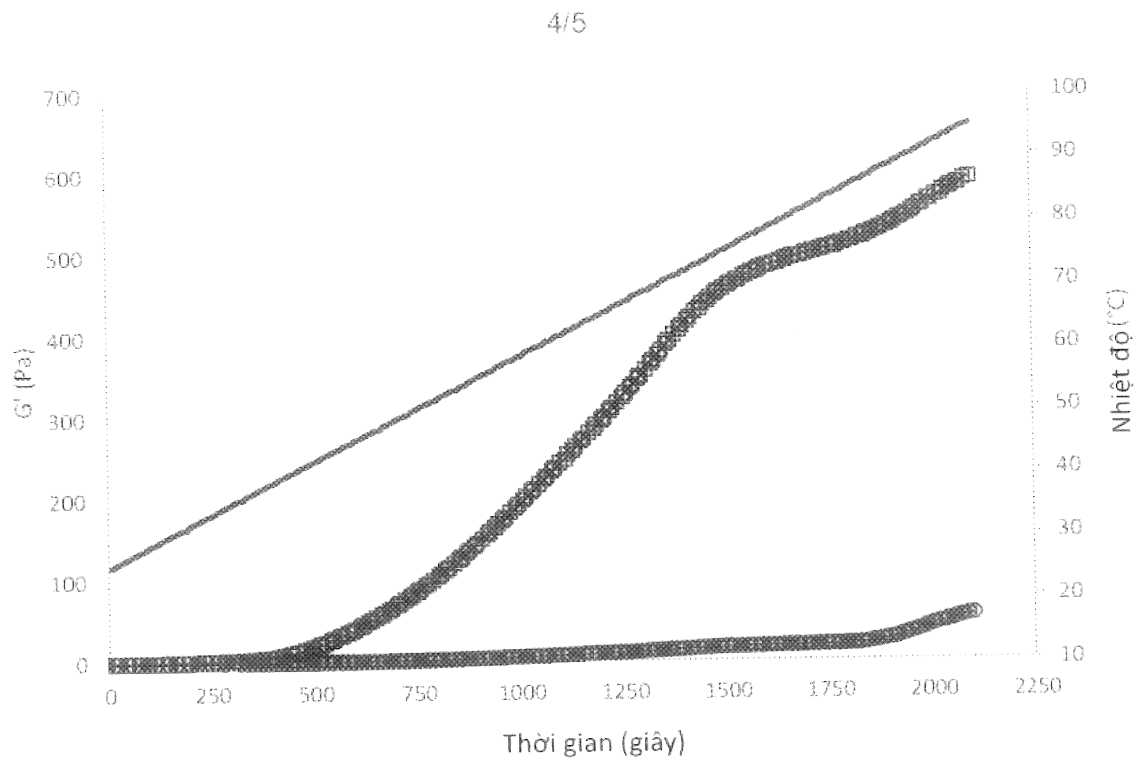


Fig. 6

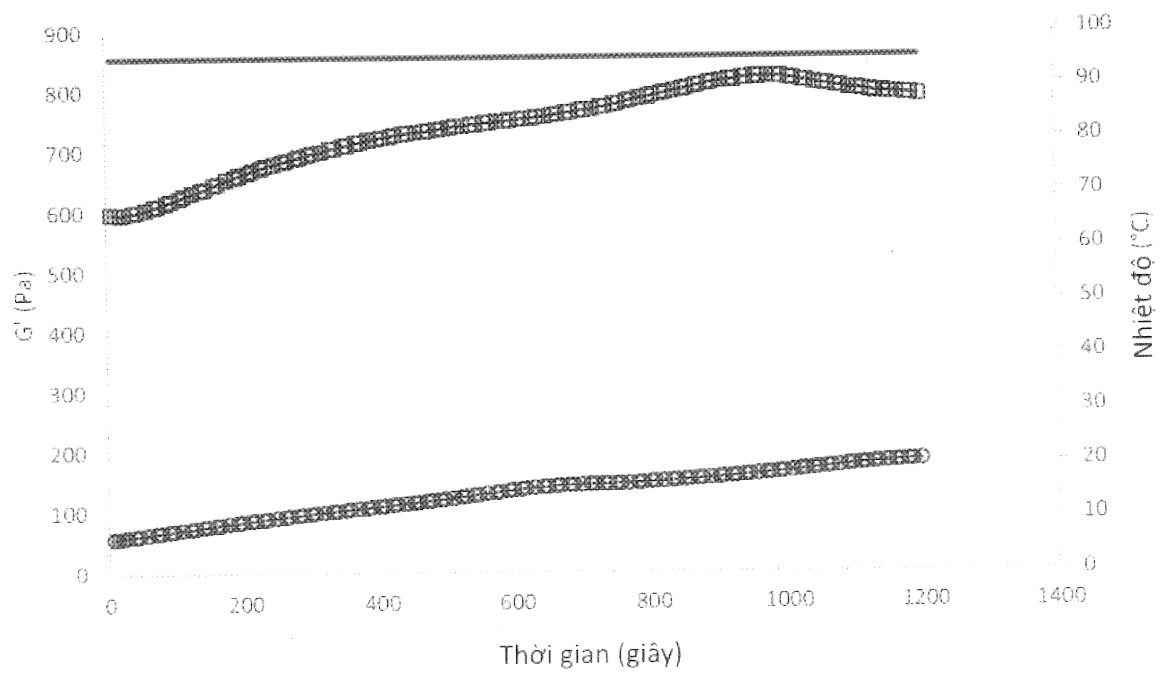
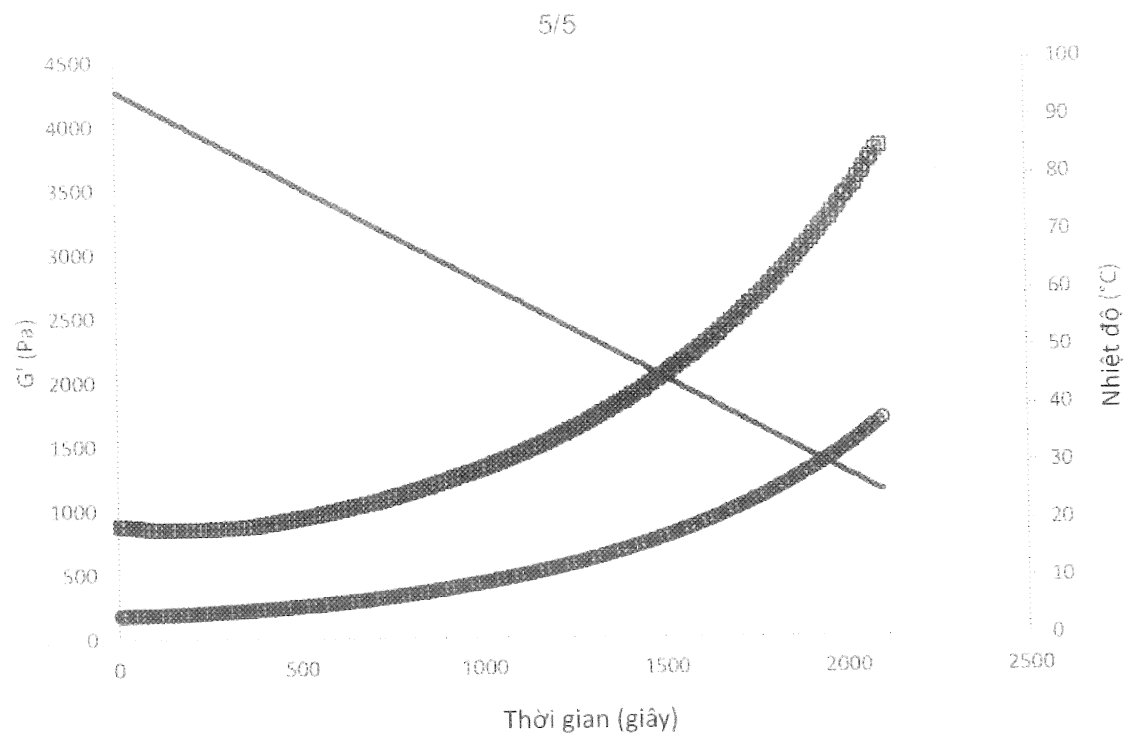


Fig. 7

**Fig. 8**