

INFLUENCE OF TECHNOLOGICAL PARAMETERS ON PROTEIN LOSSES DURING THEIR ISOELECTRIC PRECIPITATION FROM EXTRACTS

T. Nosenko

National University of Food Technologies

Key words:	ABSTRACT
<p><i>Protein extract</i> <i>Protein isoelectric precipitation</i> <i>Sunflower protein isolate</i></p>	<p>The efficiency of protein isoelectric precipitation from protein extracts depending on ionic strength of solution and precipitation pH was investigated in this study. It has been shown that protein losses with whey depend on ionic strength of an extractant and pH of isoelectric precipitation. Protein losses with supernatant decreased with the increase of ionic strength of extracts at any pH precipitation. At the same time protein precipitation efficiency was higher at lower (2.5—3.5) pH under precipitation from extracts with all investigated ionic strength. It has been shown that protein losses with whey depend on protein concentration, notably they have decreased at high protein concentration. It is found that pH of washing water also influences the protein losses and chemical composition of protein isolates.</p>
<p>Article history: Received 28.10.2014 Received in revised form 12.11.2014 Accepted 25.11.2014</p>	
<p>Corresponding author: T. Nosenko Email: tnosenko@yahoo.com</p>	

ВПЛИВ ТЕХНОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ НА ВТРАТИ БІЛКІВ ПІД ЧАС ЇХ ІЗОЕЛЕКТРИЧНОГО ОСАДЖЕННЯ З ЕКСТРАКТІВ

Т.Т. Носенко

Національний університет харчових технологій

У статті досліджено ефективність ізоелектричного осадження білків із білкових екстрактів залежно від іонної сили розчину та значення рН. Показано, що втрати білків із сироватковими водами залежать від іонної сили екстрагенту та від значення рН ізоелектричного осадження. При збільшенні іонної сили екстракту втрати білків із супернатантом менші за всі значення рН під час осадження. В той же час за всіх значень іонної сили екстрагенту ефективність ізоелектричного осадження вища за нижчі (2,5—3,5) значення рН. Зазначено, що втрати білків із сироватковими водами залежать також від концентрації білків в екстракті — вони зменшуються при високій концентрації. Встановлено, що значення рН промивної води також впливає на втрати білків і хімічний склад білкових ізолятів.

Ключові слова: білкові екстракти, ізоелектричне осадження білків, соняшниковий білковий ізолят.

Постановка проблеми. У технологіях одержання білкових ізолятів із шротів олійних культур важливою операцією, що визначає кількісний вихід ізоляту, є

вилучення білків із білкових екстрактів. Відомо, що частина екстрагованих білків втрачається із сироватковими водами, що утворюються під час осадження, тому важливим завданням є запобігання втратам білків із розчинами.

Одержання білкових ізолятів із соняшникового шроту ускладнюється наявністю в їх складі фенольних сполук — фенольної та кавової кислоти. Використання нейтральних сольових розчинів для екстрагування білків надає можливість запобігти окисненню цих речовин та їх ковалентному зв'язуванню із реакційними групами білків під час екстрагування.

Одержані дані про те, що масова частка екстрагованих із соняшникового шроту білків суттєво зростає внаслідок збільшення іонної сили екстрагенту навіть за нейтральних значень рН і ефективність такого екстрагування лише на 2—3 % нижча порівняно з екстрагуванням у лужному середовищі [1]. Перевагами екстрагування білків із соняшникового шроту в нейтральних розчинниках є запобігання окисненню та ковалентному зв'язуванню фенольних сполук із білками, яке відбувається у лужних розчинах.

Разом з тим відомо, що за високих значень іонної сили розчинника (2 Моль/дм³) приблизно 50 % білків соняшникового шроту залишаються розчинними за значень рН 4,5—5,0 [2], тому пошук шляхів зменшення втрат білків під час їх ізоелектричного осадження з білкових екстрактів у нейтральних розчинниках наразі залишається актуальним. Зважаючи на вищевикладене, **мета статті** полягає в тому, щоб дослідити вплив технологічних параметрів осадження білків із розчинів на вихід і хімічний склад білкових ізолятів.

Матеріали і методи. Сировиною для екстрагування білків був виробничий соняшниковий шрот із вмістом білків 35 %. Екстрагування білків із шроту проводили у розчині хлориду натрію за гідромодулем 10, температури 50 °С та тривалості 40 хвилин. Іонна сила розчинів хлориду натрію знаходилась в межах від 0,17 до 2,1 Моль/дм³. Нерозчинний залишок шроту відділяли від екстракту центрифугуванням при 1000 об/хв протягом 10 хвилин. Із супернатанту осаджували білки додаванням 1 Н розчину НСІ до відповідного значення рН.

Білковий осад відділяли від сироваткової води центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 15 хвилин. Супернатант декантували, а одержаний осад промивали водним розчином із відповідним значенням рН для вилучення надлишку хлориду натрію та кислоти. Осад відділяли від промивної води центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 15 хв та висушували за температури 45—50 °С.

Концентрацію білків в екстрактах визначали фотометрично Біуретовим методом [3], масову частку білків у білкових ізолятах визначали за вмістом загального азоту методом Кельдаля [3], масову частку вологи в білкових ізолятах — висушуванням до постійної маси, масову частку сирової золи (згідно з [4]).

Результати та їх аналіз

Ефективність ізоелектричного осадження білків залежно від іонної сили екстрагенту та значення рН

Нами було досліджено втрати білків з екстрактів, одержаних за значення іонної сили розчинника від 0,34 до 2,1 Моль NaCl/дм³, під час осадження в

діапазоні рН від 2,0 до 4,5 і внаслідок промивання. Більш значне зниження рН під час ізоелектричного осадження білків є недоцільним, оскільки це супроводжується дисоціацією білкових субодиноць та значною денатурацією. Концентрація білків встановлювалась однаковою для всіх екстрактів перед ізоелектричним осадженням шляхом розведення розчинів до значення 10 мг/см^3 . Втрати білків були оцінені за їх вмістом в супернатанті після відповідного ізоелектричного осадження та центрифугування.

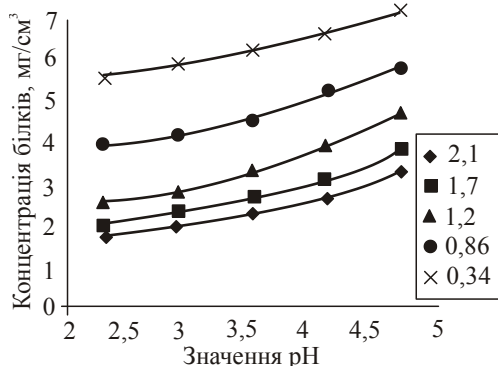


Рис. 1. Концентрація білків у супернатанті після їх осадження залежно від іонної сили екстракту і значення рН осадження

значень рН 2,5 і 3,0 і становили 57—60 % за вищих значень рН. В екстрактах із високою іонною силою втрати білків були мінімальні при рН 2,5 і 3,5 (від 21 до 28 %), з підвищенням рН до 4,5 вони зростали до 33—37 %.

Більш повне осадження білків із сольових розчинів за низьких значень рН узгоджується із виявленим зміщенням розчинності глобулінів (ізоелектрична точка рН 4,5) в сторону зменшення рН за підвищення іонної сили розчину [2, 5, 6].

Виявлений ефект впливу іонної сили розчину на ізоелектричне осадження може бути пов'язаним із змінами поверхневих зарядів білків, оскільки взаємодія білкових молекул з іонами солей може викликати зміни електрохімічних потенціалів білків унаслідок гідратації [7]. Отже, в розчинах із високою іонною силою за більш інтенсивної гідратації білкових молекул при рН, вищих за значення ізоелектричної точки, ефект іонного екранування домінує і під час підкислення розчину. Внаслідок додавання кислоти зменшується гідратація білків і відштовхування одноіменних іонів, що стимулює гідрофобні взаємодії і, врешті-решт, осадження білків. Отже, чим вищий ступінь гідратації білків (а саме це відбувається в розчинах із високою іонною силою), тим більш висока концентрація іонів гідрогену, необхідна для ізоелектричного осадження.

Крім того, більш ефективно осадження білків із розчинів з високою іонною силою може зумовлюватись відмінністю фракційного складу білків, які екстрагуються в розчинах із різною іонною силою. За високої іонної сили розчинника зростає кількість екстрагованих глобулінів, які більш схильні до кислотного осадження, ніж альбуміни [5, 6].

Мінімальні втрати білків у супернатанті становили приблизно 20 %, що зумовлено наявністю альбумінової фракції в складі білкових екстрактів, яка

не піддається ізоелектричному осадженню [5, 6]. Таким чином, зменшити втрати білків із супернатантом можна, використовуючи його для рециркуляції. Крім того, повне вилучення альбумінової фракції може бути здійснене ультрафільтрацією із використанням мембран з пропускною здатністю < 10 кДа.

Проте за значення рН < 4,1 спостерігається значна денатурація білків [8], осадження білків із розчинів із високою іонною силою необхідно проводити за значення рН приблизно 4,0—4,5.

Вплив концентрації білків на ефективність ізоелектричного осадження білків залежно від іонної сили екстрагенту.

Дослідження впливу концентрації білків в екстрактах на ефективність ізоелектричного осадження та втрати білків із супернатантом (сироватковими водами) проводились в діапазоні концентрацій білків від 10 до 30 мг/см³ та значень іонної сили розчинів 1,2—2,1 Моль/дм³. Осадження білків із розчинів проводили додаванням розчину НСІ концентрацією 0,1 Моль/дм³ до значення рН 3,5. Одержані результати наведені на рис. 2. Підвищення концентрації білкового екстракту супроводжувалось зменшенням втрат білків під час ізоелектричного осадження. Мінімальні втрати білків із супернатантом спостерігались за максимальної концентрації білків 30 мг/см³ і становили від 5 до 6,3 % від

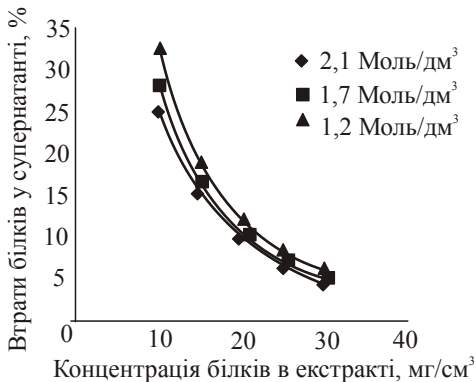


Рис. 2. Залежність втрат білків із супернатантом від концентрації білків в екстракті під час їх ізоелектричного осадження за значення рН 3,5

маси екстрагованих білків. Збільшення іонної сили екстрагенту зменшувало втрати білків за всіх досліджуваних концентрацій білків, проте найбільш виражений вплив іонної сили розчину спостерігався за мінімальної концентрації білків.

Зменшення втрат білків за підвищення їх концентрації в екстрактах пояснюється більш високою ймовірністю їх агрегації за високих концентрацій, оскільки утворення великих білкових агрегатів із дрібних є дифузійно контрольованим процесом. Утворення великих білкових агрегатів за високих концентрацій білків

також виявлено у [9]. Під час центрифугування білкові агрегати великих розмірів осаджуються більш ефективно, зменшуючи їх вміст у супернатанті.

Втрати білків під час промивання білкової пасти

У зв'язку з одержаними нами даними про зростання ефективності екстрагування білків у розчинах із високою іонною силою та зменшення втрат білків під час їх ізоелектричного осадження в більш кислому середовищі виникає необхідність подальшого вилучення надлишків хлориду натрію й кислоти з білкових осадів. Це забезпечить можливість використання ізолятів для харчових цілей у широкому спектрі продуктів, в тому числі і в кондитерських виробках.

Для цієї мети використовують на практиці одно- і двократне промивання осадів водою. При цьому виникає ймовірність часткової втрати білків із промивними водами, тому для запобігання значним втратам білків необхідно створити відповідне значення рН промивної води для запобігання розчиненню білків.

Нами досліджено втрати білків під час однократного водного промивання білків, осаджених за значення рН 3,5 та 4,5 із екстрактів з іонною силою 1,7 Моль/дм³ та концентрацією білків 20 мг/см³. Крім того, визначено вміст білків і золи у висушених білкових осадах. Значення рН промивної води встановлювали в межах 4,5—6,0. Одержані дані наведені в таблиці.

Таблиця. Втрати білків під час водного промивання після кислотного осадження і склад одержаних білкових ізолятів

Значення рН промивної води	Втрати білків, % від кількості осаджених білків		Вміст білків в ізолятах (Nx6,25), % на суху речовину		Вміст сирової золи в ізолятах, % на суху речовину	
	Осадження при рН:		Осадження при рН:		Осадження при рН:	
	3,5	4,5	3,5	4,5	3,5	4,5
4,5	9,8±0,3	8,9±0,2	83,7±0,5	84,4±0,3	5,9±0,12	5,5±0,09
5,0	10,6±0,4	9,5±0,3	84,3±0,6	85,8±0,4	5,5±0,11	5,1±0,12
5,5	11,7±0,5	10,4±0,2	86,5±0,4	87,9±0,4	5,2±0,15	4,9±0,10
6,0	12,9±0,5	11,2±0,3	87,1±0,7	88,1±0,3	4,9±0,14	4,6±0,09

Наведені дані свідчать, що приблизно 9—13 % осаджених білків втрачається при промиванні. Втрати білків із промивною водою залежать від значення рН промивної води — підвищення значення рН до 6,0 збільшує розчинність і, відповідно, їх втрати у промивній воді. В той же час на втрати білків під час промивання впливає також значення рН під час осадження. Осадження білків за значення рН 3,5 супроводжується дещо більшими втратами під час промивання білкових осадів, що може бути викликано більш високим вмістом хлориду натрію в білкових осадах при зниженні рН ізoeлектричного осадження [2]. За підвищення значення рН промивної води до 6,0 зменшується вміст золи та збільшується масова частка протеїну в ізолятах.

Таким чином, з метою покращення якості готових ізолятів білкові осадки необхідно промивати водою із значенням рН 5,5—6,0. Крім того, промивні води із вмістом білків до 2 мг/см³ необхідно використовувати для рециркуляції під час приготування розчинів на стадії екстрагування білків.

Висновки

Загальний вихід білкових ізолятів у випадку їх осадження за значення рН 4,5 був трохи нижчим порівняно з осадженням за рН 3,5 унаслідок зменшення втрат у процесі промивання білкових осадів. За рахунок зменшення витрат HCl та NaOH для осадження і нейтралізації білків осадження за значення рН 4,0—4,5 можна вважати більш оптимальним, незважаючи на те, що вихід білкових ізолятів дещо більший під час осадження за нижчих значень рН. Проте за такого значення кислотності відбувається значна денатурація білків. Оскільки білкові екстракти в розчинах хлориду натрію містять також

альбумінову фракцію білків для збільшення вилучення білків з екстрактів, то необхідно комбінувати кислотне осадження й ультрафільтрацію супернатанту. Отже, можна отримувати два типи соняшникових білкових ізолятів, які мають різні функціонально-технологічні властивості [10], що продемонстровано і для інших рослинних білків [11—13].

Література

1. *Носенко Т.Т.* Дослідження процесу екстрагування білків із шроту олійних культур / Т.Т. Носенко, І.В. Батура, В.В. Тимохін, Г.А. Федоренко // Сучасні методи створення нових технологій та обладнання в харчовій промисловості: тези доп. Міжн. наук. конф. молодих вчених, аспірантів і студентів (квітень, 2002) част.2. — Київ: НУХТ, 2002. — 40 с.
2. *Pickardt C.* Optimisation of mild-acidic protein extraction from defatted sunflower (*Helianthus annuus* L.) meal / C. Pickardt, S. Neidhart, C. Griesbach et al. // *Food Hydrocoll.*— 2009.— V. 23.— P. 1966—1973.
3. *Handbook of food analytical chemistry* / R.E. Wroslad, T.E. Acree, E.A. Decker et al.; ed. By Ronald E. Wroslad. — Vol. 1. — New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2004. — 757 p.
4. *ГОСТ 13979.6-69.* Жмыхи, шроты и горчичный порошок. Метод определения золы.
5. *Cater C.M.* The effect of chlorogenic, quinic and caffeic acids on the solubility and color of protein isolates, especially from sunflower seed / C.M. Cater, S. Gheya-suddin, K.F. Mattil // *Cereal Chem.* — 1972.—V. 49.— P. 508—514.
6. *Pawar V.D.* Studies on nitrogen extractability of defatted sunflower meal / V.D. Pawar, J.N. Patil, B.K. Sakhale et al. // *J. Food Sci. Technol.* — 2001. — V. 38. — P. 217—219.
7. *Shih Y.C.* Some characteristics of protein precipitation by salts/ Y.C. Shih, J.M. Prausnitz, H.W. Blanch // *Biotechnol. Bioeng.* — 1992. — V. 40. — P. 1155—1164.
7. *Molina I.M.* Effect of pH and ionic strength modifications on thermal denaturation of the 11S globulin of sunflower (*Helianthus annuus*) / I.M. Molina, S. Petrucelli, M.C. Anon // *J. Agric. Food Chem.* — 2004. — V. 52. — P. 6023—6029.
8. *Raphael M.* Isoelectric precipitation of sunflower protein in an MSPR precipitator: Modelling of PSD with aggregation / M. Raphael, S. Rohani // *Chem. Eng. Sci.* — 1996. — V. 51. — P. 4379—4384.
9. *Weisz G.M.* Sustainable sunflower processing—I. Development of a process for the adsorptive decolorization of sunflower [*Helianthus annuus* L.] protein extracts / G.M. Weisz, L. Schneider, U. Schweiggert et al. // *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* — 2010. — V. 11. — P. 733—741.
10. *D'Agostina A.C.* Optimization of a pilot-scale process for producing lupin protein isolates with valuable technological properties and minimum thermal damage / A.C. D'Agostina, C. Antonioni, D. Resta et al. // *J. Agric. Food Chem.* — 2006. — V. 54. — P. 92—984.
11. *This P.* Characterization of major storage proteins of sunflower and their accumulation / P. This, D. Goffner, M. Raynal et al. // *Plant Physiol. Biochem.* — 1988. — V. 26. — P. 125—132.

12. Tseng Y.M. Production of canola protein materials by alkaline extraction, precipitation, and membrane processing / Y.M. Tseng, L.L. Diosady, L.J. Rubin // J. Food Sci. — 1990. — V. 55. — P. 1147—1156.

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА ПОТЕРИ БЕЛКОВ ПРИ ИХ ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОМ ОСАЖДЕНИИ ИЗ ЭКСТРАКТОВ

Т.Т. Носенко

Национальный университет пищевых технологий

В статье исследована эффективность изоэлектрического осаждения белков из их экстрактов в зависимости от ионной силы раствора и значения рН. Показано, что потери белков из сывороточными водами зависят от ионной силы раствора и от значения рН изоэлектрического осаждения. При увеличении ионной силы экстракта потери белков из супернатантом ниже при всех значениях рН осаждения. В то же время при всех значениях ионной силы экстрагента эффективность изоэлектрического осаждения выше при низких (2,5—3,5) значениях рН. Установлено, что потери белков из сывороточными водами зависят также от концентрации белков в экстракте — они снижаются при более высокой концентрации. Значение рН промывной воды также влияло на потери белков и химический состав белковых изолятов из подсолнечного шрота.

Ключовые слова: *белковые экстракты, изоэлектрическое осаждение белков, подсолнечный белковый изолят.*