

УДК 635.655: 678.562

*Т.Т. Носенко, канд. біол. наук
Національний університет
харчових технологій*

ОДЕРЖАННЯ БІЛКОВОГО ІЗОЛЯТУ ІЗ СОНЯШНИКОВОГО ШРОТУ ЗА ДОПОМОГОЮ ПРОТЕОЛІТИЧНОГО ФЕРМЕНТУ

В роботі досліджено вплив трипсину на процес екстрагування білків із соняшникового шроту. Встановлено, що використання трипсину для екстрагування білків зі шроту викликає збільшення концентрації білків в екстрактах, яку визначали фотометрично, а також виходу кінцевого білкового продукту. Виявлено, що білковий продукт, одержаний в присутності трипсину (білковий гідролізат), має високу розчинність при всіх досліджених значеннях рН водних розчинів, а також більш високу здатність до емульгування та піноутворення у порівнянні із контролем. Одержані дані можуть бути використанні в технологіях білкових продуктів із насіння олійних культур.

***Ключові слова:** соняшниковий шрот, білкові ізоляти, гідролізати, трипсин.*

Білки олійного насіння мають високу біологічну цінність і можуть використовуватись як для кормових, так і для харчових цілей. Внаслідок вилучення олії ці речовини залишаються в збагачених білками відходах олійного виробництва — макусі або шроті. Одним із варіантів використання шротів є одержання цінних білкових добавок — білкових ізолятів. Ключовою технологічною операцією одержання ізолятів є екстрагування білків. Кількість екстрагованих білків залежить від багатьох параметрів, в першу чергу від вмісту розчинних білків у шроті, а також від параметрів процесу екстрагування. Такими параметрами є в першу чергу природа і концентрація екстрагенту, температура, співвідношення шроту та екстрагенту, тривалість, конструкція екстрактора тощо. Досліджено також, що збільшити вихід білків в екстракт можна під дією целюлаз, геміцелюлаз та пектолітичних ферментів, які гідролізують клітинні оболонки рослинних клітин [1].

Основним завданням сучасної технології білкових ізолятів є високі функціонально-технологічні властивості кінцевого продукту. Для цієї мети використовують різноманітні методи модифікації, в тому числі і ферментативні.

Останнім часом для одержання білкових гідролізатів переважно із молочних або соєвих білків широко використовуються різноманітні протеази [2—6]. Технологія одержання таких гідролізатів полягає в обмеженому гідролізі білків, ізольованих із різноманітної сировини, під дією протеолітичних ферментів. Так, зокрема, автори роботи [7] дослідили вплив протеаз різної природи, параметрів попередньої і кінцевої обробки продукту на ступінь гідролізу, вміст вільних амінокислот та середню молекулярну масу гідролізатів, одержаних із ізольованих білків соєвого шроту.

Використовуючи ензимну модифікацію білків можна суттєво змінити функціонально-технологічні властивості білкового продукту, а саме збільшити його розчинність, емульгуючу, піно- та гелеутворюючу здатність тощо.

Автори роботи [8] дослідили вплив ферментативної обробки напівзнежиреного соєвого борошна, одержаного методом екструзії-пресування, на функціонально-технологічні властивості білкового борошна. Було показано, що внаслідок неглибокого гідролізу під дією екзо- та ендопротеаз зростала розчинність білків, піноутворююча здатність та стійкість пін, в той же час емульгуюча здатність такого борошна зменшувалась.

© Т.Т. Носенко, 2012

Таким чином, враховуючи можливість індукування обмеженого гідролізу білків під дією протеаз нами було досліджено вплив протеази тваринного походження на ефективність екстрагування білків із сояшникового шроту та оцінено функціонально-технологічні властивості одержаного білкового продукту.

Для екстрагування білків використовували сояшниковий шрот із вмістом розчинних білків понад 70 %, одержаний в лабораторних умовах. Як протеолітичний фермент використовували трипсин фарм. (Merck, активність при рН 7,5, температурі 35 °С не менше ніж 200 одиниць FIP/г).

Екстрагування білків проводили за співвідношення шрот:екстрагент 1:10 та постійного перемішування, підтримуючи температуру процесу в межах 35—40 °С. Як екстрагент використовували 10%-ий розчин NaCl у фосфатному буфері (рН 7,7). В разі проведення екстракції в присутності трипсину інактивацію ферменту здійснювали шляхом нагрівання суспензії до 70 °С протягом кількох хвилин.

Концентрацію білків в екстрактах визначали фотометрично Біуретовим методом [9].

Одержання білкових ізолятів. Із одержаних екстрактів білки осаджували методом ізоелектричного осадження доводячи значення рН до 3,9—4,2 розчином 1 N HCl. Білковий осад відділяли від сироваткової води центрифугуванням при 3000 об/хв. протягом 15 хв. Супернатант декантували, а одержаний осад промивали дистильованою водою 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.

Розчинну здатність білкових ізолятів визначали в залежності від рН середовища [10]. Наважку білкового продукту суспендували у водних розчинах із різним значенням рН при співвідношенні 1:100. Значення рН задавали 0,1 N розчином гідроксиду натрію або 0,1 N розчином соляної кислоти. Суспензію білкового продукту перемішували протягом 1 години. Після цього центрифугували 10 хв при 6000 об/хв. В супернатанті визначали концентрацію білку з біуретовим реактивом за довжини хвилі 540 нм.

Піноутворюючу здатність одержаних білкових продуктів визначали в приладі Росс-Майсла за температури 20 °С. Для вимірювань готували 0,05 % розчин досліджуваного білкового продукту та вимірювали початковий стовпчик висоти піни. Піноутворюючу здатність розраховували як відношення висоти піни до висоти стовпчика рідини, виражену у %.

Емульгуючу здатність білкових продуктів визначали за значенням точки коацервації одержаних емульсій, розрахованої на одиницю маси білків. Для цього готували суспензію білкового продукту в дистильованій воді та додавали рослинну олію зі швидкістю 5 см³/с при інтенсивному перемішуванні до розшарування одержаної емульсії.

Поскільки основною фракцією білків сояшникового шроту є глобуліни для екстрагування білків із сояшникового шроту як екстрагент нами було використано розчин хлориду натрію у фосфатному буфері (рН 7,7). Фосфатний буфер використовували для створення оптимального середовища активності трипсину. Результати дослідження ефективності екстрагування білків із шроту в залежності від тривалості процесу наведені на Рис. 1. Як свідчать одержані дані, основна маса розчинних білків переходить у розчин протягом перших 20 хвилину контролю. Внесення протеолітичного ферменту в суспензію шроту суттєво збільшує ефективність вилучення білків зі шроту, максимальна кількість екстрагованих білків спостерігається після 30 хвилин екстракції. Очевидно, що більш тривалий процес досягнення максимуму екстрагованих білків в присутності трипсину пояснюється поступовою дією ферменту на білки шроту, наслідком чого є утворення поліпептидів з меншими молекулярними масами, які легко переходять в екстракт, такий механізм пояснює і сумарне збільшення маси екстрагованих поліпептидів.

Про збільшення вмісту низькомолекулярних пептидів в білкових екстрактах свідчать також дані про вміст білків в сироваточній воді, одержаній після ізоелектричного осадження білків. Отримані результати свідчать, що у випадку екстрагування білків у присутності трипсину вміст білків у розчині після їх осадження зростає від 5,7 (у контролі) до 7,1 мг/см³.

Для дослідження впливу концентрації ферменту на процес екстрагування білків визначали концентрацію білків в екстрактах змінюючи концентрацію трипсину від 0 до 1,5 мг/см³. Тривалість екстрагування становила 30 хв, інші параметри — як зазначено вище. Одержані результати (Рис. 2) свідчать, що в присутності трипсину концентрація білків в екстрактах зростала від 40 до 65 % у порівнянні з контролем. Найбільш суттєве зростання ми спостерігали при концентраціях 0,75 та 1 мг/см³, тому в наступних дослідженнях для одержання білкового продукту нами були використані саме такі концентрації ферменту.

Для одержання білкових продуктів із сояшнікового шроту використовували наступні параметри екстрагування білків (Табл.).

Технологічні параметри процесу екстрагування білків

Показник	Ізолят	Гідролізат
Температура екстрагування, °С	40	35
Тривалість екстрагування, хв.	30	30
Концентрація ферменту, мг/мл	—	0,75 – 1,0

Після екстрагування та інактивації трипсину відділяли нерозчинний залишок шроту центрифугуванням та ізоелектрично осаджували ізольований білок з екстракту. Осаджені центрифугуванням білкові осадки промивали дистильованою водою, осаджували, висушували та визначали кількісний вихід білкового продукту. Вихід білкового продукту був суттєво вищим в зразках, одержаних в присутності трипсину, збільшення виходу продукту коливалося в межах від 22 до 60 %.

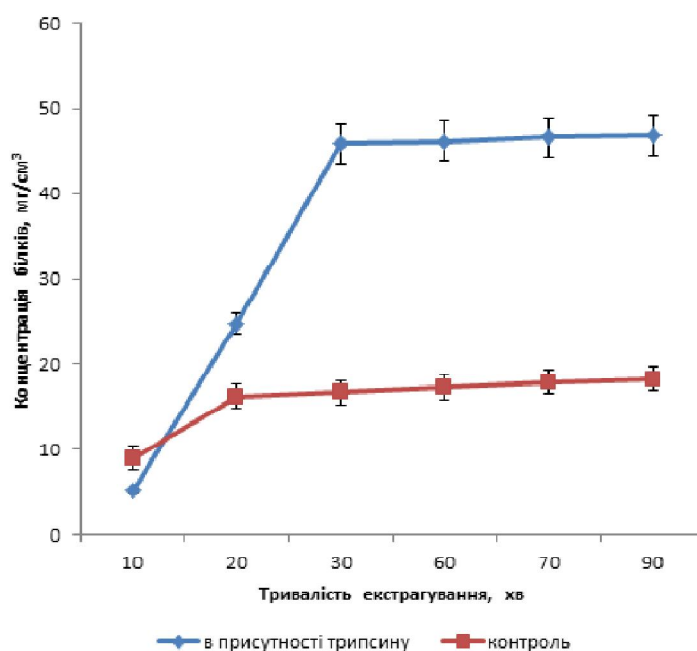


Рис. 1. Залежність концентрації білків в екстракті від тривалості екстрагування

Відмінності виходу білкового продукту в різних експериментах зумовлені гетерогенністю продуктів гідролізу з точки зору молекулярних мас поліпептидів, деякими втратами білків із сироваточними та промивними водами.

В одержаних білкових продуктах (далі — ізолят та гідролізат) визначали розчинність білку, емульгуючу та піноутворюючу здатність.

Висока розчинність білків у харчових системах важлива для стабілізації пін, емульсій, утворення гелів, тому що розчинні білки створюють високу гомогенну дисперсність молекул в таких системах та сприяють міжповерхневим взаємодіям.

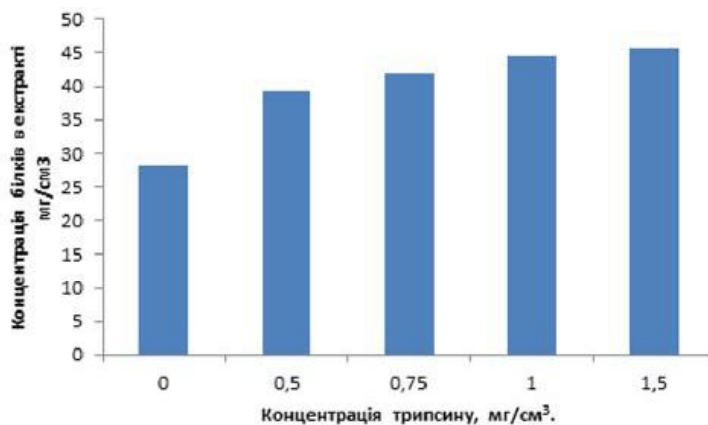


Рис. 2. Вплив концентрації трипсину на вміст білків в екстракті

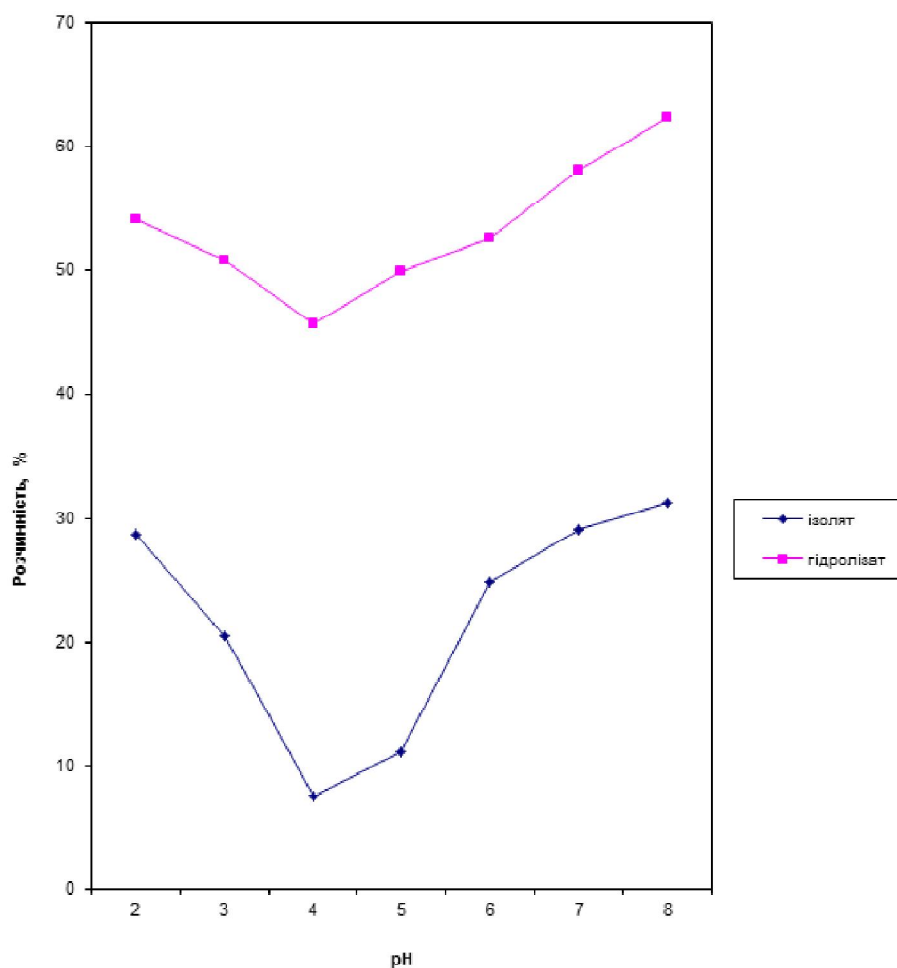


Рис. 3. Залежність розчинності білків від значення рН водних розчинів

Відомо, що розчинність білків залежить від кислотності середовища — мінімальна за значень рН середовища, що відповідає ізоелектричній точці і є максимальною в лужному середовищі (для білків олійних культур). Нами було досліджена розчинність одержаних білкових продуктів за різних значень рН розчинів (Рис. 3). Наведені результати свідчать, що розчинність білкового гідролізату у водних розчинах була суттєво вищою у порівнянні із ізолятом для всіх досліджених значень кислотності середовища, що пояснюється утворенням більш розчинних низькомолекулярних поліпептидів. Найвище зростання розчинності гідролізату було виявлене в діапазоні рН, що відповідає ізоелектричній точці білків насіння соняшнику — від 3,5 до 5,0. Збільшення розчинності білків насіння соняшнику в кислих розчинах внаслідок гідролізу під дією протеолітичних ферментів мікробіологічного походження показано також авторами роботи [3]. Проте досліджені ними гідролізати були одержані шляхом гідролізу висушеного білкового ізоляту, а розчинність білкових ізолятів та гідролізатів автори оцінювали в досліджуваному діапазоні значень кислотності середовища за залишковим вмістом білків в екстрактах, одержаних за допомогою 1 Н розчину NaOH, після осадження білків центрифугуванням.

Одержаний нами гідролізований білковий ізолят характеризувався також більш високими і іншими технологічними властивостями (Рис. 4). Зокрема, його здатність до емульгування зростала на 13 %, а до утворення пін — на 7 % у порівнянні із ізолятом.

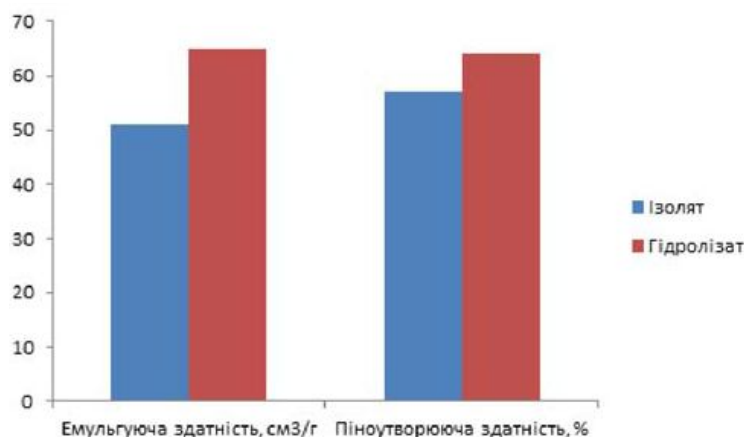


Рис. 4. Функціонально-технологічні властивості білкових продуктів

Висновки Таким чином, одержані нами результати свідчать, що при додаванні трипсину під час екстрагування білків соняшникового шроту протікає частковий гідроліз білків шроту, внаслідок чого ефективність екстрагування зростає і збільшується вихід кінцевого білкового продукту. Внаслідок обмеженого гідролізу покращуються функціонально-технологічні властивості одержаного продукту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Колпакова В.В., Борисова О.Ю., Карпова О.И., Гернет М.В. Получение белка из пшеничных отру бей с применением ферментных препаратов// *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2001, № 6, с. 12—18.
2. Adler-Nissen J.A Review Of Food Protein Hydrolysis// *Specific Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, ed. J. Adler-Nissen, Elsevier Science Publishers Ltd., Essex, England, 1986, pp. 263—313.
3. J. Parrado, F. Millan, I. Hernandez-Pinzon, J. Bautista, A. Machado Characterization of enzymic sunflower protein hydrolyzates// *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41, 11, pp. 1821—1825.

4. *Alvaro Villanueva, Javier Vioque, Raúl Sánchez-Vioque, Alfonso Clemente, Justo Pedroche, Juan Bautista, Francisco Millán*, Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates// Journal of the American Oil Chemists' Society, 1999, Volume 76, №12, pp. 1455—1460.

5. *Sara E. Molina Ortiz, Mara Cristina*, An Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates// Journal of the American Oil Chemists' Society, 2000, Volume 77, № 12, pp. 1293-1301.

6. *Kwanruedee Wachirattanapongmetee, Supawan Thawornchinsombut, Theparit Pitirit, Jirawat Yongsawatdigul, Jae Won Park*, Functional Properties of Protein Hydrolysates Prepared from Alkali-Aided Protein Extraction of Hybrid Catfish Frame// Trends Research in Science and Technology, 2009, 1, pp. 71—81.

7. *Hee Jeong Chae, Man-Jin, Min-Hong Kim In*, Process Development for the Enzymatic hydrolysis of Food Protein: Effect of Pre-treatment and Post-treatment on Degree of Hydrolysis and other Product Characteristics// Biotechnol. Bioprocess Eng., 1998, 3, 35—39.

8. *B.P. Lamsal, C. Reitmeier, P.A. Murphy and L.A. Johnson*, Enzymatic hydrolysis of extruded-expelled soy flour and resulting functional properties// Journal of the American Oil Chemists' Society, 2006, Volume 83, №8, 731—737.

9. *Журавская Н.К., Алехина Л.Т., Отряшенкова Л.М.* Исследование и контроль качества мяса и мясопродуктов. — М.:Агропромиздат, 1985. — 296 с.

10. *Доморощенкова М.Л.* Современная технологии получения пищевых белков из соевого шрота // Пищевая промышленность, 2001, № 4. с. 6—10.

Т.Т. Носенко

Получение белкового изолята из шрота подсолнечника с помощью протеолитического фермента

В работе исследовано влияние трипсина на процесс экстрагирования белков из шрота семян подсолнечника. Показано, что использование трипсина для экстрагирования белков из шрота вызывает увеличение концентрации белков в экстрактах, которую определяли фотометрически, а также выхода конечного белкового продукта. Обнаружено, что белковый продукт, полученный в присутствии трипсина (белковый гидролизат), имеет высокую растворимость при всех исследованных значениях рН водных растворов, а также более высокие эмульгирующие и пенообразующие свойства сравнительно с контролем. Полученные данные могут быть использованы в технологиях белковых продуктов из шротов масличных семян.

Ключевые слова: подсолнечный шрот, белковые изоляты, гидролизаты, трипсин.

Т. Nosenko

Protein isolate obtaining from sunflower meal with proteolytic enzyme

Influence of trypsin on the process of protein extraction from sunflower meal was investigated. It was shown that trypsin presence during protein extraction from sunflower meal resulted in increase of protein extract concentration. Higher solubility at all investigated pH values, higher foaming and emulsifying properties were detected for the protein product, obtaining in the trypsin presence (hydrolysate). Our results could be used in the oil seed protein technology.

Key words: sunflower meal, protein isolates, hydrolysates, trypsin.

e-mail: jimp@ukr.net

Надійшла до редколегії 20.06.2012 р.