УДК 544.35
Кузнецова Т.О., канд. хім. наук., Перцевой М.Ф. *(ХДУХТ, Харків)*,
Гурський П.В., канд. техн. наук *(ХНТУСГ ім. П. Василенка)*

ДОСЛІДЖЕННЯ ФРАКЦІЙНОГО БІЛКОВОГО СКЛАДУ МОДЕЛЬНИХ РОЗЧИНІВ СКЛАДОВИХ РЕЧОВИН ПРОДУКТУ СТРУКТУРОВАНОГО

У статті наведено результати досліджень фракційного білкового складу модельних розчинів речовин, що входять до складу нового продукту структурованого на основі сиру кисломолочного нежирного замороженого з використанням концентрату ядра соняшникового насіння.

Ключові слова: фракційний склад, білок, казеінат натрію, концентрат ядра соняшникового насіння, желатин, молекулярна маса, структура, міцність гелів.

Постановка проблеми та її зв'язок із найважливішими науковими та практичними завданнями. За останні роки споживання знежирених молочних продуктів із вмістом різних рослинних компонентів значно підвищилося майже в усіх країнах світу [1]. Технології виробництва молочно-рослинних продуктів спрямовані на одержання продуктів з профілактичною дією та зниженою енергетичною цінністю. Додавання рослинних компонентів до молочної основи, дозволяє збалансувати та поліпшити харчову й біологічну цінність молочного продукту завдяки введенню рослинних білків, амінокислот, вітамінів, макро- і мікроелементів та інших корисних речовин [2; 3].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Серед джерел рослинного білка важливе місце займає ядро соняшникового насіння, хімічний склад якого наведено в таблиці 1 [4]. Цей білок є найбільш наближеним до білка курячого яйця, який вважається за стандарт [5].

Таблиця 1 – Загальний хімічний склад ядра соняшникового насіння та його концентрату

Сухі речовини	Масова частка, %	
Загальний вміст сухих речовин, у тому числі:	Ядро соняшникового насіння	Концентрат ядра соняшникового насіння
Білок		
Ліпіди	25,0-57,0	9,4±0,4
Клітковина	2,5	2,7±0,1

У зв'язку з цим нами розроблено новий спосіб одержання концентрату ядра соняшникового насіння методом холодного віджимання олії з чистого ядра (безлускового) на спеціальному обладнанні за температурного режиму в межах до 50°С. Для виробництва концентрату обрано ядро соняшникового насіння кондитерського типу [6]. З таблиці 1 видно, що порівняно зі складом останнього, у концентраті ядра соняшникового насіння вміст білка збільшується практично вдвічі, а ліпідів – зменшується у 2,5…5,7 разу.

© Кузнецова Т.О. та ін., 2013

Цей концентрат, як білковий рослинний інгредієнт, було використано у розробці продукту структурованого на основі сиру кисломолочного нежирного. Виявлено, що одержаний продукт, завдяки додаванню концентрату ядра соняшникового насіння, має високу біологічну цінність за амінокислотним складом білків [7].

Метою подальших досліджень, результати яких подані в цій роботі, було визначення фракційного білкового складу модельних розчинів складових речовин продукту структурованого на основі сиру кисломолочного нежирного замороженого з використанням концентрату ядра соняшникового насіння.

Виклад основного матеріалу досліджень. До складу нового продукту входять білки ядра соняшникового насіння, казеїн і желатин. З метою дослідження фракційного білкового складу були приготовані їх модельні розчини, що відображено в таблиці 2.

Таблиця 2 – Модельні розчини складових речовин продукту структурованого

Казеїнат натрію, г	Желатин швидкорозчинний, г	Концентрат ядра соняшникового насіння, г	Вода, мл
–	3,0	–	97,0
7,7	–	–	97,0
–	–	5,0	97,0
7,7	3,0	–	97,0
–	3,0	5,0	97,0
7,7	–	5,0	97,0
7,7	3,0	5,0	97,0

Білки різних фракцій за молекулярними масами розділяли у SDS-ПААГ у системі Лемлі [8; 9]. Одержані розчини були взяті у кількості 150-300 мкг у кожній смузі в перерахунку на білок.

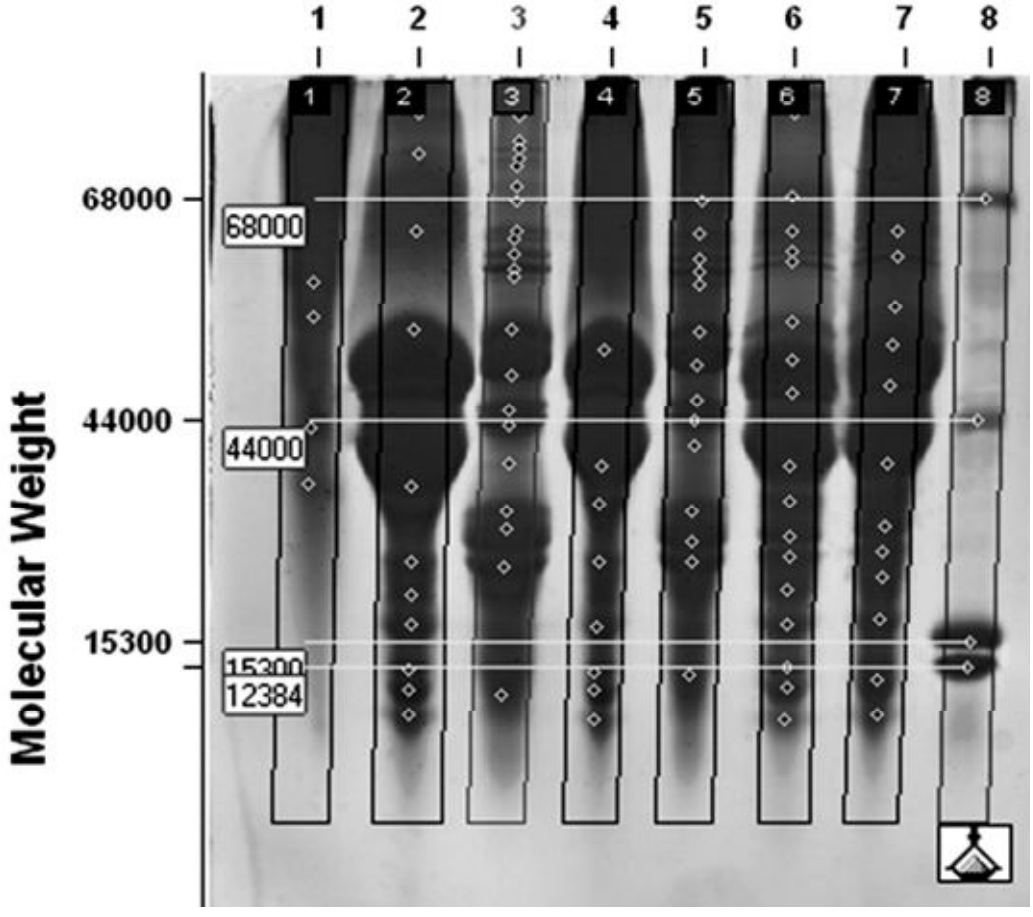
Для полімеризації 40 мл (12,5%) гелю, який використовується для розділення, змішували 16,64 мл розчину акриламіду, 15 мл буфера гелю для розділення і 7,56 мл води. До суміші додавали 0,4 мл 10% амоній персульфату і 32 мкл ТЕМЕД. Одержаний розчин поміщали в гелеву лунку для вертикального електрофорезу в пластині. На поверхню розчину наносили шарами дистильовану воду, яку після полімеризації видаляли фільтрувальним папером. Суміш для концентруючого гелю готували шляхом змішування 1,64 мл 30% розчину акриламіду з 1,26 мл буфера концентрируючого гелю та додавання 6,8 мл води (загальний об’єм 10 мл). До одержаної суміші додавали 0,1 мл 10% амоній персульфату, 10 мкл ТЕМЕД і наносили на верхівку розділюючого гелю, що заполімерізувався.

Необхідну кількість зразка модельного розчину (з урахуванням вмісту білка) насичували до 90% охолодженим ацетоном протягом 15·60 с. Білки, які випали у вигляді осаду, центрифугували з 50 об/с і розчиняли у 0,06 мл дистильованої води. Досліджувані та стандартні розчини білків кип’ятили на водяній бані протягом 5·60 с [10].

Після охолодження 20 мкл цих розчинів наносили на поверхню гелю й обережно наносили шарами електродний буфер.

До електродного буфера катодного розділення додавали натрій додецилсульфат до концентрації 0,1%. Електрофоретичне розділення проводили за температури 4°С і сили струму 20 мА. При цьому спочатку встановлювали силу струму – 10 мА (напруга 100 В), а надалі напругу піднімали до 20 мА (160 В) після того, як зразки сконцентрувалися на початку розділюючого гелю. Розділення проводили протягом 3·60·60 с. Після припинення електрофорезу виймали гель і поміщали його для фіксації у 70% розчин ізопропанолу на 60·60 с. Профарбовували гелі розчином кумасі R-250 протягом 2·60·60 с. і надлишок фарби прибирали промиванням 10% розчином оцтової кислоти. Відмиті від фонового забарвлення гелі сканували на Epson 4560 і обробляли одержані зображення у програмі Total Lab 2.0 [11; 12].

На рисунку 1 наведено результати електрофоретичного розділення білків різних фракцій за молекулярними масами.



1 – желатин; 2 – натрію казеїнат; 3 – білки ядра соняшникового насіння; 4 – желатин і натрію казеїнат; 5 – желатин і білки ядра соняшникового насіння; 6 – натрію казеїнат і білки ядра соняшникового насіння; 7 – желатин, натрію казеїнат і білки ядра соняшникового насіння; 8 – стандарт.

Рисунок 1 – Електрофоретичне розділення білків різних фракцій за молекулярними масами в SDS-ПААГ 12,5%

Як стандарт використовували суміш білків (2 мг/мл), яка складалася з сироваткового альбуміну людини (молекулярна маса *Мм* = 68,0 кДа), яєчного альбуміну (*Мм* = 44,0 кДа), α-анцюга кінського гемоглобіну (*Мм* = 15,3 кДа) і цитохрому з (*Мм* = 12,3 кДа).

Після забарвлення гелю було встановлено, що у першій лунці білок рухався цілісною масою та чітко було видно гетерогенність зразка. Швидше за все, цей зразок є сумішшю уривків гідролізованих α-частинок колагену (вихідна *Мм* = 1000 кДа).

У другій лунці, де знаходився розчин казеїнату натрію, білок рухався цілісною масою, і основними переважаючими фракціями були фракції з *Мм* = 48-54 кДа і *Мм* = 38-46 кДа.

Проте натрію казеїнат, який використовувався для досліджень, мав крім цих основних фракцій, як видно з рисунка 1, домішки низькомолекулярних компонентів у діапазоні *Мм* = 9-32 кДа.

Під час електрофорезу білків концентрату ядра соняшникового насіння (смуга 3) відбувалося розділення значної кількості індивідуальних білків з різними *Мм*. До цих білків відносяться альбуміни, глобуліни, проламіни, глютеліни та ін. [13].

У результаті електрофоретичного розділення білкових сумішей, які складалися з різних компонентів (смуги 4, 5, 6 і 7), видно, що гетерогенність желатину та натрію казеїнату привела до фонування смуг розділення білків ядра соняшникового насіння.

Аналіз основних фракцій білків, які були одержані в результаті електрофоретичного розділення досліджуваних зразків, порівняння величин *Мм* фракцій, відносний вміст яких до загальної кількості білка є найбільшим, показав, що для зразка № 1, який містить тільки желатин, що являє собою α-частинки колагену, основні фракції мають *Мм* = 80,41 (23,96%), *Мм* = 55,68 (6,59%), *Мм* = 43,08 (24,45%), *Мм* = 35,96 (41,81%).

Для казеїнату натрію – *Мм* = 64,70 (24,45%), *Мм* = 54,28 (24,77%), *Мм* = 35,82 (18,03%), *Мм* = 25,72 (4,55%), *Мм* = 12,12 (2,71%), *Мм* = 9,60 (7,14%). Для білків концентрату ядра соняшникового насіння – *Мм* = 69,52 (0,88%), *Мм* = 67,78 (1,15%), *Мм* = 64,03 (1,63%), *Мм* = 60,92 (5,8%), *Мм* = 59,91 (1,28%), *Мм* = 54,40 (9,75%), *Мм* = 49,47 (4,51%), *Мм* = 45,30 (3,21%), *Мм* = 43,47 (10,1%), *Мм* = 38,60 (0,62%), *Мм* = 32,57 (7,63%), *Мм* = 30,00 (12,33%), *Мм* = 25,01 (14,35%), *Мм* = 9,07 (15,57%).

У результаті електрофоретичного розділення білкової суміші желатину та казеїнату натрію (зразок № 4) порівняно з фракційним складом желатина (зразок № 1) і казеїнату натрію (зразок № 2) з'являються нові фракції – *Мм* = 52,26 (34,44%), *Мм* = 38,32 (23,12%) і *Мм* = 33,56 (1,27%). Поява нових фракцій з більшими *Мм* може бути обумовлена взаємодією білків казеїнату натрію та желатину.

Для білкової суміші желатину та концентрату ядра соняшникового насіння (зразок № 5) спостерігається поява п'яти нових фракцій порівняно зі складом желатину (зразок № 1) і концентрату ядра соняшникового насіння (зразок № 3). А фракції, що були наявні у зразку концентрату ядра соняшникового на-

сіння з *Мм* = 49,47 (4,51%), *Мм* = 38,60 (0,62%), *Мм* = 30,00 (12,33%), *Мм* = 9,07 (15,57%), немає у зразка № 5. Цей факт свідчить про взаємодію білків желатину та концентрату ядра соняшникового насіння. Молекулярні маси нових фракцій вищі порівняно з *Мм* фракцій білків концентрату ядра соняшникового насіння.

У результаті електрофоретичного розділення білкової суміші казеїнату натрію та концентрату ядра соняшникового насіння (зразок № 6) порівняно з фракційним складом казеїнату натрію (зразок № 2) і концентрату ядра соняшникового насіння (зразок № 3) з'являються нові фракції з *Мм* = 55,10 (4,61%), *Мм* = 50,94 (11,64%), *Мм* = 33,70 (2,09%). Білкових фракцій казеїнату натрію з *Мм* = 54,28 (24,77%) і концентрату ядра соняшникового насіння з *Мм* = 54,40 (9,75%), *Мм* = 49,47 (4,51%) і *Мм* = 45,30 (3,21%) немає у зразку № 6. Зменшення фракцій з більшими *Мм* і утворення комплексу білків з меншими *Мм* може бути обумовлено розривом ланцюгів казеїнату натрію під дією білків концентрату ядра соняшникового насіння.

Для білкової суміші желатину, казеїнату натрію та концентрату ядра соняшникового насіння (зразок № 7) спостерігається поява нових десяти білкових фракцій, *Мм* яких вищі за білкові фракції досліджуваних зразків желатину, казеїнату натрію та концентрату ядра соняшникового насіння (зразки №№ 1-3). Це свідчить про утворення зв'язків між білками ядра соняшникового насіння, желатину та казеінату натрію.

Якісний аналіз одержаних результатів електрофоретичного розділення білків різних фракцій за молекулярними масами досліджуваних зразків показав, що між білками казеїнату натрію і α-частинками колагену желатину утворюються зв'язки.

Білки ядра соняшникового насіння також взаємодіють з α-частинками колагену з утворенням молекул з більшою *Мм*. Між білками казеїнату натрію та концентрату ядра соняшникового насіння утворюються зв'язки, проте відбувається, ймовірно, розрив ланцюгів казеїнату натрію, в результаті чого утворюються білки з меншими *Мм*, а утворені зв'язки не є ковалентними, а, швидше за все, мають електростатичну природу.

Висновки.

Для модельних розчинів складових речовин продукту структурованого на основі сиру кисломолочного нежирного замороженого з використанням концентрату ядра соняшникового насіння досліджено електрофоретичне розділення білків різних фракцій за молекулярними масами у SDS-ПААГ у системі Лемлі.

Встановлено, що між білками казеїнату натрію, α-частинками колагену желатину та білками концентрату ядра соняшникового насіння утворюються зв'язки електростатичної природи.

Визначено, що в результаті утворення зв'язків між білками, що входять до складу продукту структурованого, виділяються нові білкові фракції з більшими *Мм* порівняно з фракціями чистих білків – желатину, казеїнату натрію та білків ядра соняшникового насіння.

У результаті утворення зв'язків між білками утворюється більш міцна структура гелю, що повністю підтверджується проведеними попередніми дослідженнями кінетики структуроутворення модельних систем складових речовин продукту.

Білки концентрату ядра соняшникового насіння взаємодіють з α-частинками колагену з утворенням молекул з більшою *Мм*. Між білками казеїнату натрію та концентрату ядра соняшникового насіння також є зв'язок, проте відбувається, ймовірно, розрив ланцюгів казеінату натрію, у результаті чого утворюються білки з меншими *Мм* за рахунок електростатичних зв'язків.

Список літератури

1. Попкова Г.Ю. Творожные изделия и новые технологии / Г.Ю. Попкова, В.А. Могильный // Молочная промышленность. – 2008. – № 8. – С. 12-13.
2. Горелова Н.Ф. Натуральные сыры с использованием сырья немолочного происхождения / Н.Ф. Горелова [и др.] // Сыроделие. – 1999. – № 1. – С. 12-13.
3. Неумывакин И.П. Подсолнечник. На страже здоровья / Неумывакин И.П. – М.: Диля, 2010. – 121 с.
4. Васильев Д.С. Подсолнечник / Д.С. Васильев. – М.: Агропромиздат, 1990. – 174 с.
5. Неумывакин И.П. Подсолнечник. На страже здоровья / И.П. Неумывакин. – М.: Диля, 2010. – 121 с.
6. Іхно М.П. Науково-практичні основи отримання та використання харчового безлушпинного ядра соняшника: дис. … д-ра техн. наук: 05.18.06 / М.П. Іхно. – Х., 2004. – 255 с.
7. Pertcevoi F.V. Technologies of Food Products on Base of Milk Protein: The monograph / Pertcevoi F.V. [etc.]. – Kh.: ChSUFT, 2009. – 204 p.
8. Перцевой М.Ф. Показники безпечності та біологічної цінності кулінарного структурованого продукту на основі знежиреного сиру з використанням концентрату ядра насіння соняшнику / М.Ф. Перцевой [та ін.] // Обладнання та технології харчових виробництв. – 2011. – Вип. 26. – С. 258-264.
9. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Мир, 1985.
10. Практикум по биохимии / Под ред. С.Г. Северина, Г.А. Соловьевой. – М.: МГУ, 1989.
11. Скоупс Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир, 1985.
12. Shyh-Horng Chiou Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology / Shyh-Horng Chiou, Shih-Hsiung Wu // Analytica Chimica Acta. – 1999. – № 383. – P. 47-60.
13. Электрофоретические методы анализа белков / Под ред. Р.К. Саляева, П.Д. Решетова. – Новосибирск, 1981.
14. Pérez S.G. Physico-chemical and functional properties of sunflower proteins / S.G. Pérez. – Wageningen Universiteit, 2003. – 147 p.