

STUDY OF THE INFLUENCE OF ELECTRO-SPARK TREATMENT ON WHEY PROTEIN

O. Kochubey-Lytvynenko, O. Bilyk, A. Dubivko, O. Vysotskyi, D. Shvets

National University of Food Technologies

Key words:

*Whey
Electro-spark discharges
Proteins
Protein fractions
Dispersion analysis*

Article history:

Received 17.09.2020
Received in revised form
01.10.2020
Accepted 16.10.2020

Corresponding author:

O. Kochubey-Lytvynenko

E-mail:

okolit@email.ua

ABSTRACT

The article is devoted to the study of the nature of the influence of electro-spark discharges on the fractional composition of whey proteins of different types and the aggregate state of protein particles.

The objects of the study were whey from sour milk cheese and sweet whey before and after treatment in reaction chambers with a conductive layer of magnesium and / or manganese and appropriate electrode systems. The study of changes in the dispersed state of protein particles was performed on model solutions of β -lactoglobulin (Sigma Aldrich) before and after heating to a temperature of 80°C and electro-spark treatment in the reaction chamber with a magnesium electrode system.

Based on the results of densitometric analysis of the optical density of the respective polypeptide zones, the conditional content of proteins was determined in the ranges of molecular masses of 14.2...18.4 kDa, 28.0...30.0 kDa, 60...90 kDa, 150 kDa.

The absence of significant changes in the fractional composition of the studied whey samples after electro-spark treatment was proved. A decrease in protein fractions in the range of molecular weights of 14.2...18.4 kDa and an increase in macromolecular protein fractions were observed. However, the changes were insignificant.

An assumption was made about the possible aggregation of proteins with a range of molecular weights of 14.2...18.4 kDa, in particular among themselves, under the influence of electrophysical factors, which was confirmed by the result of the dispersion analysis of a model solution of β -lactoglobulin (Sigma Aldrich) before and after heating to a temperature of 80°C and electro-spark treatment in the reaction chamber with a magnesium electrode system. Particle distribution histograms proved insignificant changes in the aggregate state of β -lactoglobulin particles after heating to 80°C and electro-spark treatment, namely slight particle aggregation and redistribution between the size range 1...10 nm and 1...1000 nm.

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ЕЛЕКТРОІСКРОВОГО ОБРОБЛЕННЯ НА БІЛКИ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ

О. В. Кочубей-Литвиненко, О. А. Білик, А. С. Дубівко,
О. О. Висоцький, Д. П. Швець

Національний університет харчових технологій

Стаття присвячена вивченню характеру впливу електроіскрових розрядів на фракційний склад білків молочної сироватки різних видів та агрегатний стан білкових частинок.

Об'єктами дослідження виступала молочна сироватка з-під сиру кисло-молочного та підсирна до та після оброблення в реакційних камерах зі струмо-провідним прошарком магнію і/або мангану та відповідними електродними системами. Вивчення змін дисперсного стану частинок білка здійснювали на модельних розчинах β -лактоглобуліну (Sigma Aldrich) до та після нагрівання до температури 80°C та електроіскрового оброблення в реакційній камері з магнієвою електродною системою.

За результатами денситометричного аналізу оптичної густини відповідних поліпептидних зон визначено умовний вміст протеїнів у діапазонах молекулярних мас 14,2...18,4 кДа, 28,0...30,0 кДа, 60...90 кДа, 150 кДа.

Доведено відсутність істотних змін у фракційному складі досліджуваних зразків молочної сироватки після електроіскрового оброблення. Відмічено зниження фракцій протеїнів у діапазоні молекулярних мас 14,2...18,4 кДа та зростання фракцій високомолекулярних протеїнів. Однак зміни несуттєві.

Висловлено припущення щодо можливого агрегування протеїнів з діапазоном молекулярних мас 14,2...18,4 кДа, зокрема між собою, під дією електрофізичних чинників, що знайшло підтвердження в результат дисперсного аналізу модельного розчину β -лактоглобуліну (Sigma Aldrich) до та після нагрівання за температури 80°C та електроіскрового оброблення в реакційній камері з магнієвою електродною системою. Гістограми розподілу частинок довели незначні зміни агрегатного стану частинок β -лактоглобуліну після нагрівання до температури 80°C та електроіскрового оброблення, зокрема незначне укрупнення частинок і перерозподіл між розмірним діапазоном 1...10 нм та 1...1000 нм.

Ключові слова: молочна сироватка, електроіскрові розряди, білки, фракції протеїнів, дисперсний аналіз.

Постановка проблеми. Проведення електроіскрового диспергування струмо-провідних гранул металів у середовищі молочної сироватки (МС) може обумовити ряд фізико-хімічних процесів. Серед них можна виокремити такі [1]:

- перехід металу електродів і струмопровідних гранул у молочну сироватку: $M \leftrightarrow M_{(атом)}$ і $M \leftrightarrow M^{n+} + ne$, де M — відповідний метал, e — вільні електрони;
- утворення оксидних фаз Магнію і Мангану;
- можлива агрегація частинок металу: $M \leftrightarrow M_{(колоїд)}$;
- окисно-відновні процеси, обумовлені дією точкового електричного розряду;
- взаємодія частинок металу з компонентами сироватки: вуглеводами, білками, молочною і лимонною кислотами тощо.

Характер перебігу перших чотирьох позицій із зазначеного переліку фізико-хімічних процесів розкрито у працях [1—4]. Однак характер впливу електроіскрових розрядів (ЕІР) на білки вивчено недостатньо. Враховуючи, що зміни білків молочної сировини можуть спричинити вплив на її біологічну цінність, важливим є детальне вивчення дії електроіскрових розрядів на білки молочної сироватки.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Відомо, що залежно від природи денатуруючого впливу, його інтенсивності, а також структури білкових молекул спостерігаються різні денатураційні стани білка. Агрегування білкових частинок — це процес, що закріплює денатураційний стан молекул і перешкоджає повному проходженню ренатурації. В агрегуванні денатурованих молекул беруть участь ті ж самі зв'язки, що стабілізують нативну структуру глобулярних білків: гідрофобні, водневі, сольові, а також іноді дисульфідні [5].

У [5; 6] фактори, що можуть спричиняти денатурацію білкових молекул, умовно розділяють на три групи: фізичні (температура, тиск, сили поверхневого натягу, ультразвук, механічний вплив тощо), хімічні (H^+ , OH^- , органічні розчинники, аміди та їх похідні тощо) і біологічні (ферменти).

Тобто інноваційний електрофізичний метод оброблення молочної сироватки, зокрема дія електроіскрового розряду в реакційному середовищі, може спричинити ймовірні зміни білків МС. Як зазначалося вище, відомості про вплив електроіскрових розрядів на білки, їхній фракційний і агрегатний стан відсутні.

Однак у [7] зазначається, що електрохімічний та електрофізичний вплив на воду й розчинні в ній сполуки, зокрема білки, спричиняють руйнування гідратної оболонки білків та їх коагуляцію. Таке оброблення МС лежить в основі отримання молочно-білкових концентратів. М. К. Балага [8] доводить, що електричний струм в обробленому середовищі веде себе як сильний окисник чи відновник. Тому для об'єктивного оцінювання якості молочної сироватки, обробленої електроіскровими розрядами, актуальним є вивчення характеру їх впливу на фракційний та агрегатний стан білків.

Метою статті є дослідження характеру змін фракційного складу й агрегатного стану білків молочної сироватки різних видів під дією електроіскрових розрядів.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження виступала молочна сироватка з-під сиру кисломолочного та підсирна до та після оброблення в реакційних камерах зі струмопровідним прошарком магнію і/або мангану та відповідними електродними системами.

Вивчення змін дисперсного стану частинок білка здійснювали на модельних розчинах β -лактоглобуліну (Sigma Aldrich) до та після нагрівання до температури $80^\circ C$ та електроіскрового оброблення в реакційній камері з магнієвою електродною системою.

Для визначення протеїнового спектра досліджуваних зразків МС використовувався метод електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ) за наявності денатуруючого агента (ДСН).

На сьогодні значного поширення у розділенні протеїнів набув гель-електрофорез у ПААГ за денатуруючих умов, зокрема за наявності відновлювального агента — 2-меркаптоетанолу (β -МЕ) та детергенту — ДСН. При використанні цього методу виходять з таких припущень: 1) після обробки ДСН протеїни зна-

ходяться в повністю денатурованому стані; 2) кількість молекул ДСН, що зв'язалися з поліпептидом, пропорційна його довжині та, відповідно, молекулярній масі; 3) власний заряд поліпептиду є неістотним порівняно із зарядом зв'язаного з ним ДСН. За таких умов усі поліпептиди мають однаковий питомий заряд і розділяються зворотно пропорційно логарифму їх молекулярної маси. Після розділення протеїнів гелі зафарбовують для візуалізації наявних поліпептидних зон.

Перед початком роботи було проведено аналіз вмісту протеїну в зразках, що необхідно для нормалізації об'ємів проб, які наносяться на пластину ПААГ. Вимірювання проводили на спектрофотометрі у кюветках з довжиною пробігу променю 1 см за допомогою спектрофотометра СФ-2000-02 (ОКБ Спектр, Росія) за методом Стошека [9]. Оптичну густину оцінювали при 280 та 320 нм, вміст протеїнів у зразку розраховували за формулою: $[\text{протеїни, мг/см}^3] = (\text{OD}280 - \text{OD}320) \times \text{розведення}$.

Після визначення концентрації протеїнів зразки молочної сироватки змішували з буфером Леммлі (1:1) такого складу: трис-НСІ буфер (62,5 ммоль/дм³, рН 6,8), 0,1% ДСН, 10% гліцерину та 0,001% бромфенолового синього та прогрівали зразки за температури +90°C протягом 5 хв. Електрофоретичне розділення проводили у пластинках 10% та градієнтного (5÷17%) ПААГ згідно з методикою [10]. Як електродний буфер використовували 25 ммоль/дм³ трис-НСІ (рН 8,6), що містив 0,192 ммоль/л гліцерину та 0,1% ДСН. Напруга при концентруванні зразків становила 45...60 В, розділення проводили за напруги, що не перевищувала 180 В. У випадку електрофорезу у 10% ПААГ концентрація протеїнів становила 50 мкг на лунку, при проведенні електрофорезу у градієнті ПААГ — 75 мкг на лунку. Після завершення електрофорезу гелі забарвлювали у спиртовому розчині Coomassie R-250 протягом 30 хв. Знебарвлювали гелі в розчині етанолу й оцтової кислоти, після чого сканували їх для отримання цифрового зображення. Відносний вміст поліпептидних зон визначали з використанням денситометричного аналізу за допомогою програми Total Lab-120 (США). Ідентифікацію поліпептидних зон проводили згідно з рекомендаціями [11].

Статистичний розподіл розмірів частинок білка в модельних розчинах визначали методом динамічного світлорозсіювання на аналізаторі Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Велика Британія) з кутом детектування 173°, гелій-неоновим лазером He-Ne потужністю 4 мВт з довжиною хвилі 633 нм. Зразки розміщували в одноразові кювети з полістиролу. Всі вимірювання здійснювалися за температури 25°C. Для контролю повторюваності результатів для кожного зразка було виконано не менше трьох-п'яти вимірів. Розподіл за розмірами в одиницях інтенсивності були отримані з аналізу кореляційних функцій з використанням алгоритму General purpose програмного забезпечення аналізатора Zetasizer Software 6.20.

Результати і обговорення. Результати електрофоретичного розділення протеїнів молочної сироватки з-під сиру кисломолочного (ССК) та підсирної (ПС) до та після електроіскрового оброблення (ЕІО) в реакційних камерах з магнієвою і/або мангановою електродними системами представлені на рис. 1.

Аналіз поліпептидного складу дослідних зразків ССК і ПС, розділених у ПААГ з різною концентрацією акриламиду, свідчить, що електрофорез у градієнті ПААГ дає змогу проводити більш повне розділення протеїнів, ніж електрофорез у моногелі (див. рис. 1 а, б). Більшою мірою це стосувалося аналізу

відносно низькомолекулярних протеїнів, у яких молекулярна маса (M_m) не перевищує 20 кДа: зокрема β -лактоглобулін (18,4 кДа) та α -лактальбумін (14,2 кДа) (див. рис. 1, а). Тому при подальшому аналізі електрофореграм вибір було зупинено на градієнтному ПААГ.

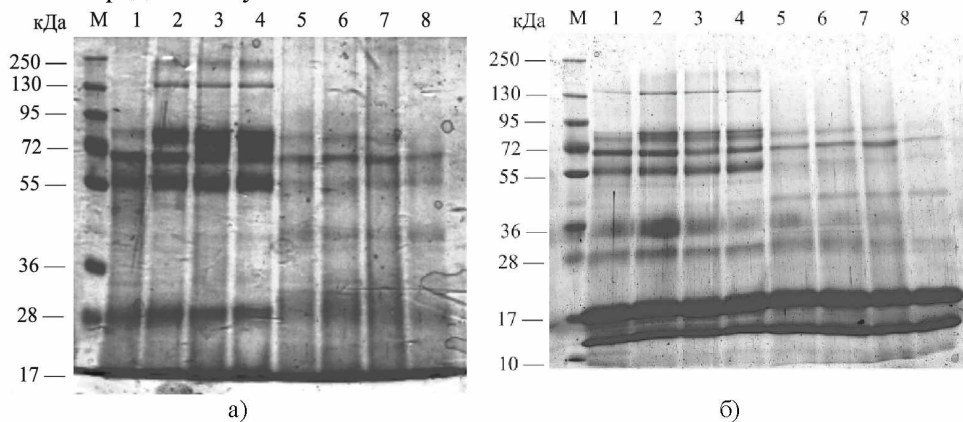


Рис. 1. Електрофореграма протеїнів молочної сироватки до та після електроіскрового оброблення, отримана з використанням диск-електрофорезу у 10% (а) та градієнтному 5÷17% ПААГ(б): 1 — ССК необроблена (контроль); 2 — ССК, оброблена в реакційній камері з магнієвою електродною системою; 3 — ССК, оброблена в реакційній камері з мангановою електродною системою; 4 — ССК, послідовно оброблена в реакційних камерах з магнієвою та мангановою електродними системами; 5 — ПС необроблена (контроль); 6 — ПС, оброблена в реакційній камері з магнієвою електродною системою; 7 — ПС, оброблена в реакційній камері з мангановою електродною системою; 8 — ПС, послідовно оброблена в реакційних камерах з магнієвою та мангановою електродними системами

За результатами денситометричного аналізу оптичної густини відповідних поліпептидних зон визначено умовний вміст протеїнів у діапазонах молекулярних мас 14,2...18,4 кДа (рис. 2, а), 28,0...30,0 кДа (рис. 2, б), 60...90 кДа (рис. 3, а), 150 кДа (рис. 3, б).

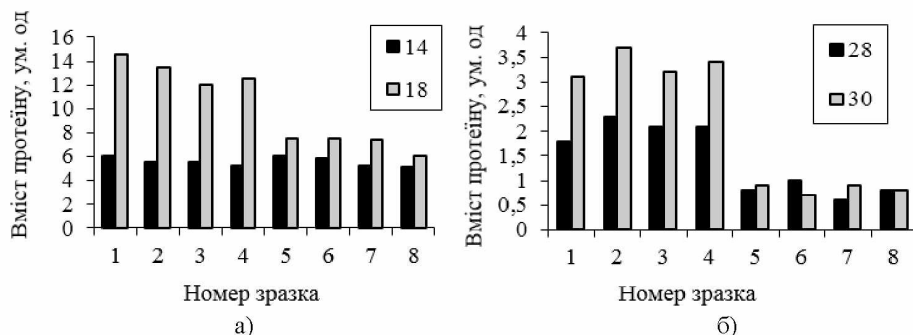


Рис. 2. Відносний вміст протеїнів у діапазонах молекулярних мас 14,2...18,4 кДа (а) та 28,0...30,0 кДа (б): 1 — ССК необроблена (контроль); 2 — ССК, оброблена в реакційній камері з магнієвою електродною системою; 3 — ССК, оброблена в реакційній камері з мангановою електродною системою; 4 — ССК, послідовно оброблена в реакційних камерах з магнієвою та мангановою електродними системами; 5 — ПС необроблена (контроль); 6 — ПС, оброблена в реакційній камері з магнієвою електродною системою; 7 — ПС, оброблена в реакційній камері з мангановою електродною системою; 8 — ПС, послідовно оброблена в реакційних камерах з магнієвою та мангановою електродними системами

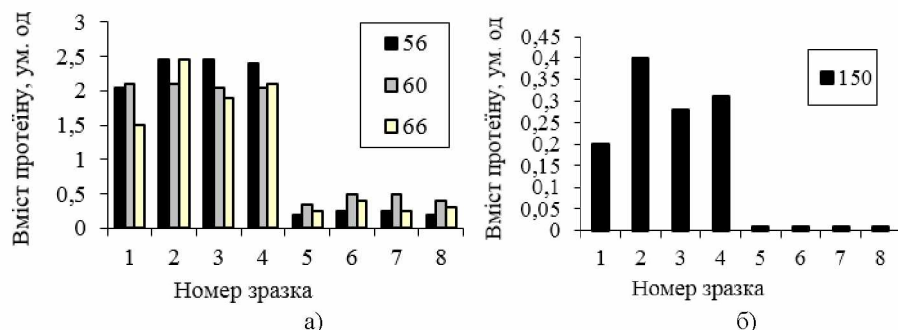


Рис. 3. Відносний вміст протеїнів у діапазонах молекулярних мас 56,0...90,0 кДа (а) та 150 кДа (б): 1 — ССК необроблена (контроль); 2 — ССК, оброблена в реакційній камері з магнієвою електродною системою; 3 — ССК, оброблена в реакційній камері з мангановою електродною системою; 4 — ССК, послідовно оброблена в реакційних камерах з магнієвою та мангановою електродними системами; 5 — ПС необроблена (контроль); 6 — ПС, оброблена в реакційній камері з магнієвою електродною системою; 7 — ПС, оброблена в реакційній камері з мангановою електродною системою; 8 — ПС, послідовно оброблена в реакційних камерах з магнієвою та мангановою електродними системами

Істотних відмінностей у фракційному складі досліджуваних зразків молочної сироватки не знайдено. Зміна відносного вмісту протеїнів різних фракцій була в межах похибки або незначною.

Так, аналіз фракції протеїнів у діапазоні молекулярних мас 14,2...18,4 кДа, що відповідають α -лактальбуміну та β -лактоглобуліну, засвідчив зниження відносної кількості першого лише на 0,1...0,4 ум. од., другого — на 1,0...2,5 ум. од. Таке зниження відносної кількості протеїнів цих фракцій можна пояснити похибкою вимірювання та незначною денатурацією в зоні електроіскрового розряду. Слід відмітити, що ступінь зниження цих протеїнів різнився залежно від виду МС, що можна пояснити відповідно до [5; 6] сукупним впливом хімічного і фізичного денатуруючих факторів — рН і електроіскрових розрядів.

Перехід дестабілізованих сироваткових білків фракцій α -лактальбуміну та β -лактоглобуліну з розчинного у нерозчинний стан, як відомо, може супроводжуватися агрегуванням між собою та міцелами ККФК. Це відбувається внаслідок імовірного вивільнення неполярних і полярних реакційних груп та цілих ланок пептидного ланцюга при розверненні поліпептидного ланцюга під дією електроіскрового розряду та формування нових зв'язків [8]. Результати аналізу фракції у діапазоні молекулярних мас 28,0...30 кДа (2, б) підтверджують можливий перебіг таких подій, що засвідчує незначне зростання сумарної умовної кількості ізоформ казеїну після електроіскрового оброблення на 0,1 ум.од. для ПС та 0,5...1,0 ум. од. для ССК. Найбільше зростання (на 1,0 ум.од.) спостерігалось в ССК після оброблення в реакційній камері з магнієвою електродною системою, що пояснюється формуванням додаткових магнієвих місточків для комплексоутворення. Проте слід відмітити, що об'єм МС, який піддається впливу електроіскрових розрядів менше 1%, тому дія можливого денатуруючого фактора незначна.

Підтвердженням висловленого припущення щодо можливого агрегування протеїнів з діапазоном молекулярних мас 14,2... 18,4 кДа, зокрема між собою, під дією електрофізичних чинників є результати дисперсного аналізу модельного розчину β -лактоглобуліну (Sigma Aldrich) до (рис. 4, а), після нагрівання до температури 80°C (рис. 4, б) та ЕІО в реакційній камері з магнієвою електродною системою (рис. 4, в). Так, гістограми розподілу частинок доводять незначні зміни агрегатного стану частинок β -лактоглобуліну після нагрівання за температури 80°C та ЕІО, зокрема спостерігається незначне укрупнення частинок і перерозподіл між розмірним діапазоном 1... 10 нм та 1... 1000 нм. Характер змін під дією температурного чинника та електроіскрових розрядів був подібним.

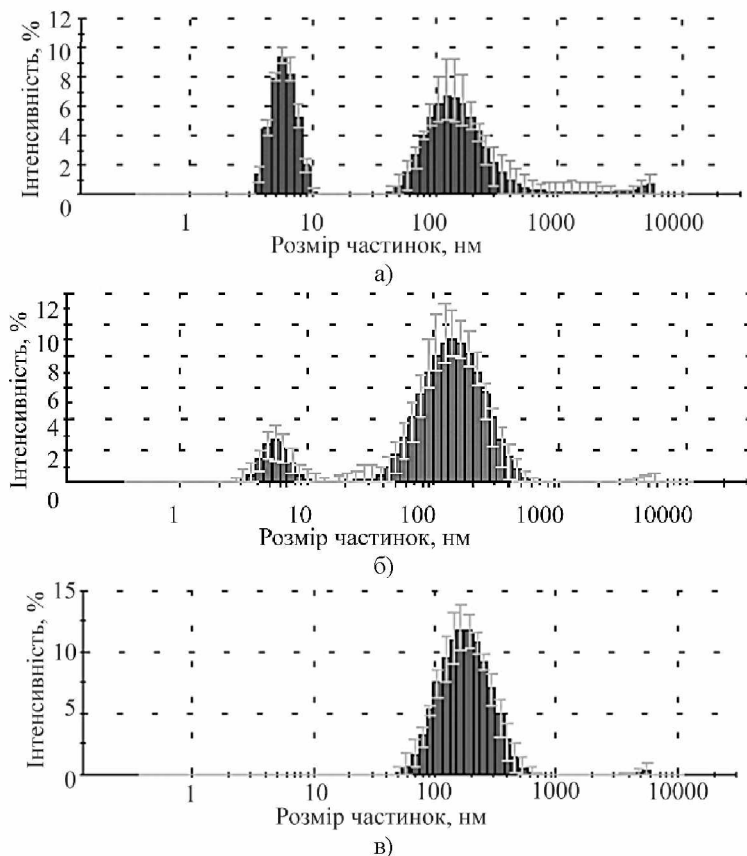


Рис. 4. Дисперсний аналіз модельного розчину β -лактоглобуліну (Sigma Aldrich):
а — до оброблення; б — після нагрівання за температури 80°C; в — ЕІО в реакційній камері з магнієвою електродною системою

Наявність у дослідному зразку, обробленому в реакційній камері з магнієвою електродною системою, частинок розміром 1... 10 мкм пояснюється збагаченням його частинками магнію в ультра- та мікророзмірному діапазонах.

У дослідних зразках МС після електроіскрового оброблення спостерігається зростання фракцій протеїнів в діапазонах 56,0... 90,0 кДа та 150 кДа. Проте, як і в попередніх фракціях, зміни незначні.

Однак варто зазначити, що зразки за вмістом цих фракцій розташовані так: № 2 > № 4 ≥ № 3 > № 1, у зразках 5—8 зміни практично невідчутні. Це спостереження можна пояснити збільшенням іонів магнію в зразках 2 і 4, що відіграють роль додаткових містків при зв'язуванні пептидів та амінокислот.

Важливе спостереження стосується наявності у незначних кількостях високомолекулярних поліпептидів з молекулярною масою ~ 230 кДа після електрофорезу у пластині 10% ПААГ (рис. 1, а) в зразках № 2—4, тоді як у зразках 1, 5—8 вони були відсутніми.

Висновки

Отже, доведено відсутність істотних змін у фракційному складі досліджуваних зразків молочної сироватки після електроіскрового оброблення. Відмічено зниження фракцій протеїнів у діапазоні молекулярних мас 14,2... 18,4 кДа та зростання фракцій високомолекулярних протеїнів. Однак зміни несуттєві.

Література

1. Кочубей-Литвиненко О. В., Іщенко В. М., Лопатько К. Г., Фоменко В. В. Перетворення компонентів молочної сироватки в процесі електроіскрового оброблення. *Прогресивні техніка та технології харчових виробництв ресторанного господарства і торгівлі*. 2015. № 2. С. 316—326.
2. Кочубей-Литвиненко О. В., Чернюшок О. А. Електрофізичний спосіб збагачення сухої молочної сироватки мінеральними елементами. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гіжцького*. 2017. Т. 19, № 75. С. 115—119.
3. Кочубей-Литвиненко О. В., Лопатько К. Г. Спосіб обогачення молочної сыворотки коллоїдними частинками магнія і марганця. *Scientific works of University of food technologies*. 2015. Vol. 62. P. 131—134.
4. Kochubei-Lytyvnenko O. The effect of electrical discharge treatment of milk whey on partial conversion of lactose into lactobionic acid. *Food Science and Technology*. 2018. 12(3). PP. 40—49.
5. Hafiz A. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization. CRC Press LLC, 2005. 389 p.
6. Мудрикова О. В., Митрохин П. В. Исследование влияния детергентов на белки молока. *Техника и технология пищевых производств*. 2010. № 1(16). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/issledovanie-vliyaniya-detergentov-na-belki-moloka> (дата обращения: 14.08.2020).
7. Спринчан Е. Г. Оптимизация выделения белков при электрофизической обработке молочной сыворотки. *Электронная обработка материалов*. 2010. № 6(266). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/optimizatsiya-vydeleniya-belkov-pri-elektrofizicheskoy-obrabotke-molochnoy-syvorotki> (дата обращения: 12.08.2020).
8. Болога М. К., Пыргару Ю. М. Процессы электроконтактной коагуляции сывороточных белков. *Электронная обработка материалов*. 1993. № 6. С. 46—50.
9. Stoscheck C. M. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990. Vol. 182. P. 50—68.
10. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. 4. *Nature*. 1970. № 227. P. 680—685.
11. Milk protein — from structure to biological properties and health aspects. Editor by Isabel Gigli, Intech. 2016. 298 p.