

Invenția se referă la industria produselor lactate, și anume la prelucrarea non-reziduală a zerului cu utilizarea tuturor fracțiilor proteice, ce posedă proprietăți funcționale și nutriționale valoroase, având ca scop obținerea fracțiilor proteice cu un conținut proteic predeterminat.

Zerul conține o varietate de proteine – una din ele fiind alfa-lactalbumina (α -La). Alfa-lactalbumina reprezintă 20% din proteinele zerului laptelui bovin, sunt proteine mici, formate din 123 resturi de aminoacizi, 67 dintre care sunt aminoacizi esențiali, cu masa moleculară de 14,2 kDa (Farrell, Jr., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang, K. F., Swaisgood H. E. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *J. Dairy Sci.*, 2004, 87, pp. 1641–1674). Aceasta este o proteină reglatoare a complexului enzimatic *lactose syntetasa*, iar concentrația lactozei în lapte este direct legată de concentrația de α -La (Caffini J.P., Poutrel B., Rainard P. Physiological and Pathological Factors Influencing Bovine α -lactalbumin and β -lactoglobulin concentrations in milk. *Journal of Dairy Science*, 1985, 68(5), pp.1087-940). Alfa-lactalbumina este o proteină mică cu proprietăți acide (pI 4-5) de afinitate înaltă față de ionii de Ca^{2+} și alți cationi bivalenți (Bernal V., Jelen P. Effect of calcium binding on thermal denaturation of bovine α -lactalbumin. *Journal of Dairy Science*, 1984, 67(10), pp.2452-2454). Laptele uman (matern) are o concentrație ridicată de proteine serice (70% din proteinele totale), iar α -La reprezintă proteina majoră și constituie circa 40% (Permyakov E.A., Berliner L.J. Alpha-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett.*, 2000, 473 (3), p. 269-274).

Elaborarea formulelor alimentare dietetice și a celor pentru copii, ce conțin în mare parte α -La și alte substanțe vitale, este o problemă foarte importantă pentru producători.

Există diferite tipuri de produse proteice extrase din zer: izolate proteice din zer, concentrate proteice din zer, hidrolizate proteice din zer, concentrate proteice minerale (CPM). Izolatele proteice din zer conțin proteine în cea mai pură formă, cel puțin 90% de proteine (Cheang B, Zydney AL. A two-stage ultrafiltration process for fractionation of whey protein isolate. *Journal of Membrane Science*, 2004; 231: 159-167).

Concentratele proteice din zer au un nivel scăzut de grăsimi și glucide, iar conținutul proteic în funcție de concentrație constituie 30...90%, conțin cele mai multe substanțe nutritive benefice găsite în mod natural în zer (R. Božanić, I. Barukčić, K. Lisak, J. Tratnik, L. Tratnik. Possibilities of Whey Utilisation. *Austin J Nutri Food Sci.*, 2014;2(7): 7).

Hidrolizatele proteice din zer (HPZ) se obțin la hidroliza parțială a proteinelor serice din zer pentru absorbția mai rapidă a proteinelor și sunt utilizate în suplimente medicale și în preparatele pentru copii datorită potențialului alergen redus (Cheison SC., Leeb E., Tero-Sierra J., Kulozik U. Influence of hydrolysis temperature and pH on the selective hydrolysis of whey proteins and potential recovery of native alpha-lactalbumin. *International Dairy Journal*, 2011; 21: 166-171).

Concentratele proteice minerale (CPM), obținute la electroactivare, conțin proteine serice și minerale, mărind valoarea biologică a concentratelor obținute, utilizate atât în industria farmaceutică, cât și în cea alimentară (Спринчан Е.Г. Оптимизация выделения белков при электрофизической обработке молочной сыворотки. *Электронная обработка материалов*, V.46, №6, 2010, 81-87, ISSN 0013-5739).

Sunt cunoscute diferite procedee și metode de extragere a α -La din zer și obținerea concentratelor îmbogățite cu această fracție proteică.

Este cunoscut procedeul ce permite tratarea amestecului de proteine din zer pentru creșterea concentrației relative a proteinei α -La în amestec. Procedeul include etapa de ajustare a temperaturii amestecului de proteine din zer la circa 10°C și a valorii pH-ului mai mare de 7. În plus, prevede adăugarea unei enzime de protează în amestecul proteinelor din zer care hidrolizează selectiv proteina β -lactoglobulină (β -Lg) în amestec. Activitatea enzimatică a proteazei este stopată în amestecul proteic al zerului hidrolizat, înainte ca α -La să fie hidrolizată de enzimă. În unele cazuri, amestecul de proteine din zer poate include de asemenea glicomacropptide, care sunt hidrolizate selectiv cu proteina β -Lg. Hidrolizatele de β -Lg și glicomacropptide pot fi separate pentru a obține o compoziție de α -La ajustată pentru utilizarea în formule pentru sugari și alte produse [1].

Dezavantajele acestui procedeu sunt: ajustarea suplimentară a soluțiilor tampon la anumite valori ale pH-ului, caracterul consecutiv de obținere a fracțiilor proteice și durata mare de prelucrare, proceduri suplimentare de activare și inactivare a enzimelor.

Este cunoscut procedeul care se referă la extragerea proteinelor din zer și obținerea unui produs din zer și a unui izolat din zer. În particular, acest procedeu se referă la producerea unui izolat ce conține β -Lg și a unui izolat îmbogățit cu α -La obținute din zer. Izolatul proteic obținut din zer este bogat în α -La și imunoglobulină G, având un conținut redus de β -Lg. Metoda are la bază utilizarea schimbului de ioni – a unui suport cromatografic, și utilizarea unor soluții tampon de eluare la anumite valori pH, ce necesită o ajustare specială. Etapele procedurii sunt:

- 1) furnizarea zerului;
- 2) ajustarea zerului la valoarea pH 4,5 sau mai mică;
- 3) furnizarea/incărcarea zerului în suportul cromatografic;
- 4) spălarea opțională a suportului cromatografic, utilizând o soluție tampon pentru spălare și obținerea unei fracții de spălare;
- 5) separarea β -Lg din suportul cromatografic utilizând soluția tampon de eluare, menționată mai sus, ce are valoarea pH 4 sau mai mică și o concentrație de sare de cel puțin 0,1M;
- 6) eluarea izolatului proteic îmbogățit cu α -La cu o a doua soluție tampon de eluare [2].

Dezavantajele acestui procedeu sunt:

- ajustarea suplimentară a soluțiilor tampon de eluare;
- spălarea rășinii;
- caracterul consecutiv de obținere a fracțiilor proteice și durată mare de prelucrare.

Este cunoscut și procedeul care se referă la separarea selectivă a α -La din proteinele zerului. Procedeul include un tratament termic al zerului concentrat anterior la un conținut de substanță uscată de 10...40% și acidularea până la o valoare a pH-ului mai mică de 4, de preferință 3...3,5, urmat de un tratament termic la o temperatură care nu depășește 75°C, de preferință 45...75°C, pe o durată de la 15 secunde la o oră, astfel încât să se sedimenteze selectiv α -La. După tratamentul termic are loc recuperarea α -La sub formă de precipitat și posibil a celorlalte proteine serice rămase în soluțiile zerului rezidual [3].

Dezavantajele acestui procedeu sunt:

- ajustarea suplimentară a valorilor pH;
- temperaturi înalte de prelucrare;
- durată mare de prelucrare.

Cel mai apropiat de invenția propusă este procedeul de prelucrare a zerului, care include răcirea zerului până la o temperatură de 5...10°C, separarea zerului de praful de cazeină (poate fi efectuată numai în cazurile, când concentratul proteico-mineral se extrage pentru utilizare în industria farmaceutică cu scopul obținerii fracțiilor de proteină cu un grad de puritate mai înalt), electroactivarea zerului în regim periodic pe o perioadă de 20...30 min în celula catodică a unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică, până la o temperatură finală a zerului ce nu depășește 50°C, la o densitate a curentului de 10,0...20,0 mA/cm², cu debitarea în celula anodică a unei soluții de ioni de calciu cu concentrația de 1...2%, colectarea concentratelor proteice minerale sub formă de spumă și separarea acestora din faza lichidă în câmp de forțe masice, uscarea ulterioară a concentratelor proteice minerale, spre exemplu, prin liofilizare la temperaturi joase. Zerul deproteinizat cu conținutul lactulozei inversate de peste 30% este expedit la prelucrarea ulterioară pentru separarea acesteia [4].

Dezavantajul procedeuului cunoscut este, că acesta nu prevede obținerea concentratelor proteice minerale cu conținut proteic predeterminat, spre exemplu, a concentratelor proteice minerale înnobilate cu α -La.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția dată constă în obținerea din zer a concentratului proteic mineral înnobilat cu alfa-lactalbumină cu obținerea simultană a lactulozei.

Problema se soluționează prin aceea că, se propune un procedeu de obținere din zer a concentratului proteic mineral înnobilat cu alfa-lactalbumină, care include răcirea zerului până la temperatura de 10...14°C, separarea de praful de cazeină, electroactivarea zerului în regim periodic în celula catodică a unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică, la o densitate a curentului de 10,0...20,0 mA/cm², timp de 20...30 min, până la temperatura de 20...40°C, cu debitarea în celula anodică a unei soluții de ioni de calciu cu concentrația de 2%, separarea fazei spumoase a zerului de faza lichidă, colectarea concentratului proteic mineral, prin centrifugare, din faza spumoasă la valori ale pH-ului de 12,00...12,20 și din faza lichidă la valori ale pH-ului de 11,00...11,50, după care concentratul proteic mineral se usucă la temperaturi ce exclud denaturarea termică a proteinelor, iar zerul deproteinizat este dirijat la prelucrarea ulterioară pentru separarea lactulozei.

Totodată în celula anodică se debitează soluție de clorură de calciu.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea concentratelor proteice minerale înnobilate cu 50...67% alfa-lactalbumine în faza spumoasă și 50...70% în faza lichidă, cu obținerea simultană a lactulozei.

Valori maxime au fost înregistrate la prelucrarea zerului cu conținut de proteine de 12...14 mg/ml, care se obține în cantități destul de mari la prelucrarea laptelui, și a permis obținerea concentratelor proteice înnobilate cu α -La de circa 67...70% la 20 min de prelucrare, la temperatura de 36-37°C și valori intens alcaline în intervalul pH-ului de 11,00...12,20.

În continuare sunt prezentate două exemple de realizare a invenției propuse în conformitate cu fig. 1, care reprezintă diagrama variației procentului de extracție a alfa-lactalbuminei în concentratul proteic mineral în funcție de regimurile de prelucrare, pH-ul și temperatura fazei spumoase și lichide ale zerului.

În diagramă s-au adoptat următoarele notații: E1 și E2 – exemplele de realizare ale invenției; pH – potențialul de hidrogen; t, [°C] – temperatura, α -La, [%] – procentul de extracție a alfa-lactalbuminei; (S) - în faza spumoasă a zerului; (L) - în faza lichidă a zerului.

Procedeul propus se realizează în felul următor. Zerul se răcește până la temperatura de 10...14°C, se separă de praful de cazeină. Prelucrarea zerului se realizează prin electroactivare în regim periodic în celula catodului unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică cu debitarea în celula anodului a unei soluții de ioni de calciu cu concentrația de 2%. Electroactivarea zerului se realizează timp de 20...30 min la densitatea curentului de 10,0...20,0 mA/cm². Temperatura finală a zerului în perioada de prelucrare se va menține în intervalul 20...40°C, sub temperatura de denaturare a proteinelor serice (55...60°C). Faza spumoasă a zerului se separă de faza lichidă rămasă în celula catodului. Colectarea concentratului proteic mineral, înnobilat cu alfa-lactalbumină, se realizează din faza spumoasă la valori intens alcaline ale acesteia, la un pH de 12,00...12,20, iar din faza lichidă la valori alcaline, la un pH de 11,00...11,50. Concentratele proteice minerale se separă în câmp de forțe masice la 1500G, apoi se usucă la temperaturi joase, spre exemplu prin liofilizare. Zerul deproteinizat se expediază la prelucrarea ulterioară pentru separarea lactulozei.

Exemple de realizare a procedurii

Protocolul experimentelor efectuate este următorul.

Extragerea CPM înobilată cu α -La a fost cercetată la prelucrarea electrofizică a zerului cu conținut de proteine de 12...14 mg/ml, furnizat de Societatea pe acțiuni "JLC", Chișinău, Republica Moldova, obținut după fabricarea produsului de brânză, cu conținutul de grăsimi de 18%.

Zerul este răcit, separat de praful de cazeină și prelucrat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40 la diferite densități ale curentului în intervalul 10...20 mA/cm² timp de 20...30 min respectiv. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu de 2%, pentru menținerea conductibilității mediului și livrarea ionilor bivalenți în celula catodului prin membrană. Zerul prelucrat este în două faze: sub formă de spumă - faza spumoasă și fracția ce rămâne în celula catodului - faza lichidă; din ambele ulterior se separă CPM, prin centrifugare la 1500 G. Zerul deproteinizat, ce conține lactuloză izomerizată, este prelucrat ulterior, iar concentratul proteico-mineral, înobilat cu α -La, este uscat la temperaturi joase, de exemplu prin liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracției proteice extrase.

Conținutul fracțiilor proteice extrase din zer în CPM au fost analizate prin electroforeză cu SDS-PAGE 15%, extrase cu soluția tampon 0,05 M Tris-HCl 0,5 M NaCl, 0,5 mM EDTA (0,04% NaN₃), pH 8,0. Rezultatele obținute au fost scanate cu HP Scanjet 3800, prelucrate cu software-ul Microsoft Photo Editor și analizate cu Phoretix 1D Advans pentru a se determina cantitatea fracțiilor proteice în CPM.

Extragerea fracției proteice de α -La la valori pH intens alcaline ale fazei spumoase și alcaline ale fazei lichide a fost depistată în toate exemplele studiate, obținându-se valori maxime în ambele faze.

Exemplul 1 (E1)

Zerul cu un conținut de proteine de 12...14 mg/ml este răcit până la temperatura de 10°C, separat de praful de cazeină și prelucrat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40 la densitatea curentului $j=10$ mA/cm², timp de 30 min, regim periodic. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu de 2%. Din zerul prelucrat se separă spuma - faza spumoasă, din care în continuare, prin centrifugare la 1500G, se separă CPM. Zerul deproteinizat, ce conține lactuloză izomerizată, este prelucrat ulterior, iar concentratul proteico-mineral înobilat cu α -La este uscat la temperaturi joase, de exemplu prin liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracției proteice extrase. Faza lichidă din care se extrage CPM, reprezintă fracția ce rămâne după prelucrarea zerului în celula catodului.

Extragerea CPM înobilat cu α -La constituie circa 50% (valoarea maximă) în faza spumoasă cu valoarea pH-ului de 12,20, la 30 min de electroactivare, la temperatura de 23...25°C și circa 50% în faza lichidă cu valoarea pH-ului 11,50.

Exemplul 2 (E2)

Zerul cu un conținut de proteine de 12...14 mg/ml este răcit până la temperatura de 14°C, separat de praful de cazeină și prelucrat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40 la densitatea curentului $j=20$ mA/cm², timp de 20 min, regim periodic. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu de 2%. Din zerul prelucrat se separă spuma - faza spumoasă, din care în continuare, prin centrifugare la 1500G, se separă CPM. Zerul deproteinizat, ce conține lactuloză izomerizată, este prelucrat ulterior, iar concentratul proteico-mineral înobilat cu α -La este uscat la temperaturi joase, de exemplu prin liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracției proteice extrase. Faza lichidă din care se extrage CPM, reprezintă fracția ce rămâne după prelucrarea zerului în celula catodului.

Extragerea CPM înobilat cu α -La constituie circa 67% (valoarea maximă) în faza spumoasă cu valoarea pH-ului de 12,20, la 20 min de electroactivare, la temperatura de 35...37°C și circa 70% în faza lichidă cu valoarea pH-ului de 11,00.

După cum rezultă din fig. 1 valori maxime au fost înregistrate la tratarea zerului cu un conținut de proteine de 12...14 mg/ml. Au fost obținute concentrate proteice minerale înobilate cu 67...70% de α -La, la 20 min de prelucrare, la temperatura de 35...37°C și la valoarea pH-ului de 12,20 a fazei spumoase și valoarea pH-ului de 11,00 a fazei lichide.