

Invenția se referă la industria produselor lactate, la procesarea non-reziduală a zerului cu utilizarea tuturor fracțiilor proteice, ce posedă proprietăți funcționale și nutriționale valoroase, având ca scop obținerea concentratelor proteice cu conținut predeterminat, ce pot fi utilizate în formule alimentare dietetice și pentru copii, și anume la un procedeu de obținere din zer a concentratului proteic mineral (CPM) îmbogățit cu beta-lactoglobulină ( $\beta$ -Lg).

Procesarea non-reziduală a produselor lactate secundare este una din cele mai acute probleme discutate în lume.

Sunt cunoscute procedee ce permit obținerea diferitor concentrate și izolate proteice din zer, ce conțin proteine derivate din zer, depind de procesul tehnologic primar și sunt utilizate pe scară largă în industria alimentară datorită proprietăților funcționale și nutriționale valoroase [Jacopo Bacenetti, Luciana Bava, Andrea Schievano, Maddalena Zucali, Whey protein concentrate (WPC) production: Environmental impact assessment, Journal of Food Engineering, Volume 224, May 2018, p. 139-147; Alexandra L. Yver, Laetitia M. Bonnaille, Winnie Yee, Andrew McAloon, Peggy M. Tomasula, Fractionation of whey protein isolate with supercritical carbon dioxide – process modeling and cost, Int. J. Mol. Sci., 2012, 13, p. 240 – 259].

Beta-lactoglobulina ( $\beta$ -Lg) constituie 50% din proteinele din zer și 12% din conținutul proteic total al laptelui.  $\beta$ -Lg nativă este o proteină mică globulară cu masa moleculară de 36,6 kDa cu structură secundară și terțiară definită. În soluții apoase la un pH de 5-7, la temperatura camerei, această proteină este sub formă de dimer, adică este constituită din două subunități identice. Masa moleculară a fiecărei subunități este de 18,3 kDa și constă din 162 aminoacizi, dintre care 84 - aminoacizi esențiali și patru - resturi de cisteină [J. N. de Wit, G. Klarenbeek. Effects of various heat treatments on structure and solubility of whey proteins. J. Dairy Sci. 1984, 67, 2701-2710; Caessens P., Visser S., Gruppen H. Method for the isolation of bovine  $\beta$ -Lactoglobulin from a cheese whey protein fraction and physicochemical characterization of the purified product, Int. Dairy J., 1997, 7(4), p. 229-235].  $\beta$ -Lg reprezintă o sursă excelentă de aminoacizi proteogeni atât esențiali, cât și neesențiali.

Este cunoscut procedeu de separare din zer a alfa-lactalbuminei ( $\alpha$ -La) de  $\beta$ -Lg sau a concentratelor proteice extrase din zer. Procedeu include etapele de tratare a zerului sau a concentratelor proteice extrase din zer cu un agent de complexare. Agentul de complexare formează complecși insolubili cu  $\beta$ -Lg din zer sau din concentratele proteice extrase din zer. Complecșii insolubili sunt apoi separați în concentrate proteice, obținându-se astfel un precipitat, ce conține predominant  $\beta$ -Lg și cantități mici de  $\alpha$ -La și un supernatant, ce conține predominant  $\alpha$ -La și cantități mici de  $\beta$ -Lg [1].

Dezavantajele acestui procedeu sunt: complexitatea procesului, ce include operații de obținere separată a fracțiilor proteice, care măresc durata de procesare, dar și utilizarea unui agent de complexare de natură chimică, care necesită izolarea ulterioară a acestuia prin ultrafiltrare.

Este cunoscut și procedeu de obținere a unei fracții îmbogățite predominant cu  $\alpha$ -La și a altei fracții îmbogățite predominant cu  $\beta$ -Lg la procesarea zerului prin metoda cromatografică, ce permite reținerea  $\beta$ -Lg în reșina cromatografică și cuprinde următoarele etape: 1) furnizarea zerului; 2) contactarea zerului cu reșina cromatografică, care asigură reținerea predominantă a  $\beta$ -Lg; 3) obținerea permeatului, din reșina cromatografică, care conține predominant  $\alpha$ -La; 4) spălarea opțională a suportului cromatografic și obținerea unui retentat extras din reșina cromatografică; 5) obținerea fracției de  $\beta$ -Lg din retentatul extras din reșina cromatografică. Zerul furnizat în etapa 1 este astfel secăt sau substanțial secăt de cel puțin două-trei proteine [2].

Dezavantajele acestui procedeu sunt: complexitatea procesului, necesitatea spălării periodice a reșinei, durata mare de procesare și necesitatea parcurgerii unor operațiuni tehnologice suplimentare.

De asemenea, este cunoscut procedeu ce se referă la izolarea proteinelor din zer și extragerea a două izolate din zer. În particular, acest procedeu se referă la producerea unui izolat ce conține  $\beta$ -Lg și a unui izolat îmbogățit cu  $\alpha$ -La obținute din zer. Metoda are la bază utilizarea schimbului de ioni și utilizarea unor soluții tampon de eluare cu anumite valori pH, ce necesită o ajustare specială. Etapele procedeuului cunoscut sunt: 1) furnizarea zerului; 2) ajustarea zerului la valoarea pH-ului de cel mult 4,5; 3) furnizarea zerului în suportul cromatografic; 4) spălarea opțională a suportului cromatografic, utilizând o soluție tampon; 5) eluarea  $\beta$ -Lg din suportul cromatografic utilizând soluția tampon ce are valoarea pH-ului de cel mult 4 și o concentrație de sare de cel puțin 0,1 M; 6) eluarea izolatului proteic îmbogățit cu  $\alpha$ -La cu o a doua soluție tampon de eluare [3].

Dezavantajele acestui procedeu sunt: complexitatea procesului, ajustarea suplimentară a soluțiilor tampon de eluare; necesitatea spălării periodice a reșinei; caracterul complex de obținere a fracțiilor proteice, toate măbind durata de procesare.

Cel mai apropiat de invenția propusă este procedeu de obținere din zer a concentratului proteic mineral îmbogățit cu alfa-lactalbumină, care include răcirea zerului până la temperatura de 10...14°C, separarea de praful de caseină, 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/cm<sup>2</sup>, timp de 20...30 min, până la temperatura de 20...40°C, cu debitarea în celula anodică a unei soluții de clorură 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 [4].

Dezavantajele acestui procedeu sunt: procedeu nu prevede obținerea concentratului proteic mineral îmbogățit cu beta-lactoglobulină, durata mare de procesare.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția constă în obținerea din zer a concentratului proteic mineral înobilat cu beta-lactoglobulină, cu un procent înalt de extracție și cu izomerizarea simultană a lactozei în lactuloză.

Problema se soluționează prin aceea că, se propune un procedeu de obținere din zer a concentratului proteic mineral înobilat cu beta-lactoglobulină, care include răcirea zerului până la temperatura de 10-14°C, separarea zerului 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/cm<sup>2</sup>, cu debitarea în celula anodică a unei soluții de clorură de calciu cu concentrația de 2%, separarea fazei spumoase a zerului de faza lichidă, colectarea concentratului proteic mineral, prin centrifugare, din faza spumoasă, 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.

Particularitatea procedeuului propus constă în faptul că, electroactivarea zerului se realizează prin alimentarea ciclică a electrolizorului cu curent continuu cu durata ciclului de 60 s și pauza dintre cicluri de 10 s timp de 5...10 min, concentratul proteic mineral se colectează din faza spumoasă la valori ale pH-ului de 8,00...11,00, iar temperatura finală a zerului se menține în intervalul de 15...20°C.

Rezultatul tehnic al invenției constă în obținerea concentratului proteic mineral înobilat cu 57...72% beta-lactoglobuline în faza spumoasă, în faza lichidă concentrația acestora fiind foarte redusă, cu obținerea simultană a lactozei și cu reducerea de 3...4 ori a timpului de procesare.

Valori maxime au fost înregistrate la alimentarea ciclică a electrolizorului cu curent continuu cu durata ciclului de 60 s și pauza dintre cicluri de 10 s timp de 5...10 min, la valori ale pH-ului fazei spumoase de 8,00...11,00 și temperaturi finale ale zerului în intervalul de 15...20°C.

Procentul de colectare a concentratului proteic mineral înobilat cu β-Lg depinde de regimul de electroactivare a zerului procesat (ciclic sau continuu), de timpul de procesare, de temperatura finală a zerului și de valoarea pH-ului fazei spumoase. Regimul de alimentare cu curent al electrolizorului trebuie să fie corelat cu procesele de electroactivare și relaxare a complexului proteic din zer. Pe cale experimentală s-a stabilit, că în condiții similare la creșterea duratei ciclului de alimentare cu curent continuu al electrolizorului, iar în consecință, la reducerea pauzei dintre cicluri, procentul de extracție a β-Lg se reduce, apropiindu-se asimptotic de valoarea procentului de extracție la alimentarea continuă cu curent al electrolizorului. Maximul procentului de extracție a β-Lg se obține la durata ciclului de 60 s și pauza dintre cicluri de 10 s.

În continuare sunt prezentate patru exemple de realizare a invenției propuse în conformitate cu fig. 1, care reprezintă diagrama variației procentului de extracție a β-Lg în concentratul proteic mineral în funcție de regimurile de prelucrare, pH-ul fazei spumoase și temperatura finală a zerului. În diagramă s-au adoptat următoarele notații: E1, E2, E3 și E4 – exemplele de realizare ale invenției; pH – potențialul de hidrogen; t, [°C] – temperatura finală a zerului, β-Lg, [%] – procentul de extracție a β-Lg.

Zerul a fost răcit până la temperatura de 5...14°C și separat de praful de cazeină. Prelucrarea zerului s-a realizat prin refularea periodică a zerului în celula catodului unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică cu debitarea în celula anodului a unei soluții de clorură de calciu cu concentrația de 2%.

Electroactivarea zerului a fost efectuată timp de 5...10 min la densitatea curentului de 10,0 și 20,0 mA/cm<sup>2</sup> în două variante.

În prima variantă electroactivarea zerului s-a realizat prin alimentarea ciclică a electrolizorului cu curent continuu, cu o durată a ciclului de 60 s și o pauză dintre cicluri de 10 s, iar în varianta a doua - prin alimentarea continuă. Temperatura finală a zerului în perioada de prelucrare s-a menținut în intervalul de 15...20°C, sub temperatura de denaturare a proteinelor (55...60°C). Faza spumoasă a zerului a fost separată de faza lichidă. Colectarea concentratului proteic mineral, înobilat cu beta-lactoglobulină, s-a realizat din faza spumoasă la valori ale pH-ului de 8,00...11,00, la alimentarea ciclică cu curent a electrolizorului, și la valori ale pH-ului de 8,00...9,00, la alimentarea continuă cu curent al electrolizorului. Concentratul proteic mineral s-a separat în câmp de forțe masice, spre exemplu prin centrifugare la 1500 G, apoi s-a uscat la temperaturi joase, spre exemplu prin liofilizare. Zerul deproteinizat a fost dirijat la prelucrarea ulterioară pentru separarea lactulozei.

Exemple de realizare a procedeuului.

Extragerea concentratului proteic mineral (CPM) înobilat cu β-Lg a fost cercetată la electroactivarea zerului obținut după producerea brânzei de vaci cu conținutul de grăsime de 2%, furnizat de Societatea pe acțiuni "JLC", Chișinău, Republica Moldova.

Efectul extracției CPM înobilat cu β-Lg a fost stabilit la electroactivarea zerului în regim ciclic de alimentare a electrolizorului cu curent continuu, durata ciclului de 60 s și pauza dintre cicluri de 10 s și în regim continuu de alimentare a electrolizorului cu curent continuu în aceleași condiții.

Zerul a fost răcit, separat de praful de cazeină și prelucrat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40 la densități ale curentului electric de 10 și 20 mA/cm<sup>2</sup> timp de 5...10 min în regim ciclic de alimentare și în regim continuu de alimentare. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu (CaCl<sub>2</sub>) de 2%, pentru menținerea conductibilității mediului și livrarea ionilor bivalenți în celula catodului prin membrana eterogenă cationică MK-40.

Concentratul proteic mineral înobilat cu β-Lg a fost colectat din faza spumoasă, iar faza lichidă - separată de cea solidă prin centrifugare la 1500 G. CPM înobilat cu β-Lg a fost uscat la temperaturi joase, spre exemplu prin

liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracțiilor proteice extrase. Faza lichidă, ce prezintă zerul deproteinizat și conține lactuloză izomerizată, a fost procesat ulterior pentru separarea lactulozei.

Conținutul fracțiilor proteice extrase din zer în CPM a fost analizat prin electroforeză cu SDS-PAGE 15%, extrase cu soluție tampon de 0.05 M Tris-HCl 0,5 M NaCl, 0,5 mM EDTA (0,04%  $\text{NaN}_3$ ), pH 8,0. Rezultatele obținute au fost scanate prin intermediul HP Scanget 3800 cu software-ul Microsoft Photo Editor și analizat cu Phoretix 1D Advans pentru a se determina cantitatea fracțiilor proteice în CPM.

Electroactivarea zerului în regim ciclic și în regim continuu de alimentare a electrolizorului cu curent continuu a permis identificarea mai multor fracții proteice care variază în dependență de regimul de procesare, volumul de zer procesat, durata procesării, variația valorilor pH-ului și ale temperaturii zerului.

A fost studiat experimental procesul de extracție a  $\beta$ -Lg la electroactivarea zerului în regim ciclic și regim continuu de alimentare a electrolizorului cu curent continuu fiind realizate și analizate următoarele exemple.

#### *Exemplul 1*

Zerul a fost răcit până la temperatura de 10°C, separat de praful de cazeină și refulat în celula catodică a unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu de 2%. Zerul a fost procesat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40, la densitatea curentului electric de 10 mA/cm<sup>2</sup>, timp de 5 min, în regim ciclic de alimentare a electrolizorului cu curent continuu cu durata ciclului de 60 s și pauza dintre cicluri de 10 s. Concentratul proteic mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg a fost colectat din faza spumoasă, iar faza lichidă - separată de cea solidă prin centrifugare la 1500 G.

Faza lichidă, ce prezintă zerul deproteinizat și conține lactuloză izomerizată, a fost procesată ulterior, iar faza solidă ce prezintă concentrat proteic mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg - uscată la temperaturi joase, de exemplu prin liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracției proteice extrase.

Extragerea CPM înobilat cu  $\beta$ -Lg constituie circa 70...72% la 5 min de procesare, la temperatura zerului de 17...20°C și valoarea pH de 8,00...9,00.

#### *Exemplul 2*

Zerul a fost răcit până la temperatura de 10°C, separat de praful de cazeină și refulat în celula catodică a unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu de 2%. Zerul a fost procesat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40, la densitatea curentului electric de 20 mA/cm<sup>2</sup>, timp de 10 min, în regim ciclic de alimentare a electrolizorului cu curent continuu cu durata ciclului de 60 s și pauza dintre cicluri de 10 s. Concentratul proteic mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg a fost colectat din faza spumoasă, iar faza lichidă - separată de cea solidă prin centrifugare la 1500 G.

Faza lichidă, ce prezintă zerul deproteinizat și conține lactuloză izomerizată, a fost procesată ulterior, iar faza solidă ce prezintă concentrat proteic mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg - uscată la temperaturi joase, de exemplu prin liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracției proteice extrase.

Extragerea CPM înobilat cu  $\beta$ -Lg constituie circa 57...59% la 10 min de procesare, la temperatura zerului de 27...30°C și valoarea pH de 10,50...11,00.

#### *Exemplul 3*

Zerul a fost răcit până la temperatura de 10°C, separat de praful de cazeină și refulat în celula catodică a unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu de 2%. Zerul a fost procesat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40, la densitatea curentului electric de 10 mA/cm<sup>2</sup>, timp de 5 min, în regim continuu de alimentare a electrolizorului cu curent continuu. Concentratul proteic mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg a fost colectat din faza spumoasă, iar faza lichidă - separată de cea solidă prin centrifugare la 1500 G. Faza lichidă, ce prezintă zerul deproteinizat și conține lactuloză izomerizată, a fost procesată ulterior, iar faza solidă ce prezintă concentrat proteico-mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg - uscată la temperaturi joase, de exemplu prin liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracției proteice extrase.

Extragerea CPM înobilat cu  $\beta$ -Lg constituie circa 57...59% la 5 min de procesare, la temperatura zerului de 18...20°C și valoarea pH de 8,00...9,00.

#### *Exemplul 4*

Zerul a fost răcit la temperatura de 10°C, separat de praful de cazeină și refulat în celula catodică a unui electrolizor cu membrană ion-selectivă cationică. În calitate de lichid secundar în celula anodului s-a utilizat soluție de clorură de calciu de 2%. Zerul este procesat în electrolizorul cu diafragmă cu membrană eterogenă cationică MK-40, la densitatea curentului electric de 20 mA/cm<sup>2</sup>, timp de 10 min în regim continuu de alimentare a electrolizorului cu curent continuu. Concentratul proteic mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg a fost colectat din faza spumoasă, iar faza lichidă - separată de cea solidă prin centrifugare la 1500 G. Faza lichidă, ce prezintă zerul deproteinizat și conține lactuloză izomerizată, a fost procesat ulterior, iar faza solidă ce prezintă concentrat proteico-mineral înobilat cu  $\beta$ -Lg a fost

uscată la temperaturi joase, de exemplu prin liofilizare, pentru excluderea denaturării termice a fracției proteice extrase.

Extragerea CPM înobilat cu  $\beta$ -Lg constituie circa 35...38% la 10 min de procesare, la temperatura zerului de 22-24°C și valoarea pH de 9,00...10,00.

Variația extragerii  $\beta$ -Lg în CPM în dependență de regimurile de alimentare a electrolizorului cu curent, de valorile pH-ului și a temperaturii în exemplele E1-E4 este prezentată în figură.

Se observă, că extracția  $\beta$ -Lg în CPM variază în limitele 57-72% și este condiționată de creșterea valorilor pH și temperaturii zerului, care la rândul lor sunt în interdependență cu regimurile de electroactivare, și anume, regimul ciclic de alimentare a electrolizorului cu curent continuu, la densitatea curentului electric de 10...20 mA/cm<sup>2</sup> și durata de procesare de 5...10 min, comparativ cu alimentarea în regim continuu a electrolizorului.

Astfel, la valori egale ale temperaturii finale a zerului și ale densității curentului, dar la valori mici ale timpului de procesare, procentul de extracție a  $\beta$ -Lg este mai mare în varianta alimentării ciclice cu curent al electrolizorului.