



УДК: 577.112.083, 577.175.19

Н.В. Хабибулина

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ И ОЧИСТКИ ФРАКЦИИ СОЕВЫХ ИЗОФЛАВОНОИДОВ СОВМЕСТНО С ИЗОЛЯТОМ БЕЛКА СОИ

Influence of various parameters (temperature, time, concentration of ethyl spirit) on isoflavones extraction process from a soybean flakes was studied, on the basis of what the choice of optimum extraction conditions was made. The sequence of the stages allowing to carry out joint reception of soya protein isolate and soya isoflavones is defined. Such methods of clearing of isoflavones fraction from albumen impurities, as ion-exchange chromatography and a liquid-liquid extraction were investigated.

Изучено влияние различных параметров (температуры, времени, концентрации этилового спирта) на процесс извлечения изофлавоноидов из белого лепестка сои, на основании чего произведен выбор оптимальных условий экстракции. Определена последовательность стадий, позволяющая осуществлять совместное получение изолята белка сои и соевых изофлавоноидов. Исследованы такие методы очистки фракции изофлавоноидов от примесных белковых веществ, как ионообменная хроматография и жидкость-жидкостная экстракция.

Одним из приоритетных направлений пищевой химии является создание функциональных пищевых продуктов, оказывающих регулирующее воздействие на отдельные системы и организм в целом. В последние годы большое внимание уделяется флавоноидам сои, биологическая активность которых делает их важным структурным элементом при конструировании пищевых продуктов нового поколения [4].

Изофлавоноиды — кислородсодержащие гетероциклические соединения. В сое содержится три изофлавоноида (даидзеин, генистин, глицитин) в четырех химических формах - агликоны, гликозиды, и их ацетильные и малонильные производные. Биологическая роль изофлавоноидов выражается в том, что они являются натуральными эстрогенами, обладают антиоксидантным и антиканцерогенным действием, а также противовоспалительной и противовирусной активностью [1].

Основным направлением переработки сои является получение различных белковых продуктов, в частности, изолята белка сои. Существующие технологии предполагают раздельное получение изолята белка сои и соевых изофлавоноидов, что связано со значительными затратами сырья и реагентов, а также образованием больших количеств отходов. При этом при получении изолята белка сои отходы содержат такие ценные вещества, как изофлавоноиды, а выделение отдельно соевых изофлавоноидов не предполагает получения белковых продуктов. В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение процесса получения изолята белка сои совместно с фракцией изофлавоноидов.

Материалы и методы:

Экстракцию белковых веществ из белого лепестка проводили из 10%-



ной суспензии при pH 2,0 и комнатной температуре. Отработанную биомассу сои отделяли центрифугированием.

Экстракцию изофлавоноидов из белого лепестка проводили из 10%-ной суспензии при различных концентрациях этилового спирта (40 – 96 %), различных температурах (25 – 78⁰С) в течение заданного промежутка времени. Отработанную биомассу сои отделяли центрифугированием.

Содержание изофлавоноидов в получаемых экстрактах определяли по цветной реакции с треххлористым железом с построением калибровочного графика по стандартным растворам дигидрокверцетина.

Определение белка проводили колориметрическим модифицированным методом Лоури.

Стадию ультрафильтрации проводили с применением плоских мембранных элементов.

Качество изолятов оценивали по содержанию сырого протеина, определяемого микрометодом Кьельдаля.

Острую токсичность полученных препаратов определяли с помощью тест-культуры инфузорий *Tetrachymena pyriformis*.

Очистку ионным обменом проводили как в статических, так и в динамических условиях. Ионный обмен в динамических условиях осуществляли на колонке длиной 20 см и диаметром 2 см, процесс вели в режиме насыщения колонки.

Очистку методом жидкость-жидкостной экстракции проводили в конических колбах с притертой пробкой при постоянном перемешивании на магнитной мешалке.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований необходимо было подобрать оптимальные условия извлечения ИФ из белого лепестка. Из литературных данных известно, что для извлечения изофлавоноидов из растительного сырья используются такие экстрагенты, как метанол, этанол, хлороформ, ацетонитрил и ряд других органических растворителей [3], поэтому в качестве экстрагента был выбран этиловый спирт, так как он является малотоксичным и относительно недорогим. Кроме того, так как разрабатываемая технология предполагает также получение пищевого продукта — изолята, использование этилового спирта является предпочтительным.

При изучении таких параметров экстракции, как концентрация спирта, температура и время экстракции, было установлено, что оптимальной концентрацией является 80% этанол, температура 78⁰С и время 2 часа.

Целью данной работы было получение изолята белка сои совместно с фракцией изофлавоноидов. Данный процесс можно организовать согласно двум принципиальным схемам (рис 1).

Первая схема. Сначала проводится экстракция белковых веществ, затем твердый остаток используется для извлечения изофлавоноидов.

Вторая схема. Стадия извлечения изофлавоноидов предшествует выделению белковых веществ. В ходе работы были проанализированы обе схемы с целью подбора оптимальной последовательности стадий, при этом в



качестве критерия рассматривалось максимальное содержание изофлавоноидов в экстракте без потери качества изолята.

Согласно полученным результатам, при проведении спиртовой экстракции перед кислотной содержание изофлавоноидов в полученном экстракте в 2 раза выше, чем в случае обратной последовательности стадий. При этом содержание белковых веществ при кислотной экстракции изменяется незначительно. Качество получаемых при этом изолятов практически не отличается.

Из вышесказанного следует, что совместное получение изолята белка сои и изофлавоноидов следует вести по технологической схеме 2: сначала проводится спиртовая экстракция изофлавоноидов, затем из твердого остатка проводится экстракция белковых веществ. Из белкового экстракта по известной схеме затем получают изолят, а экстракт изофлавоноидов проходит стадию очистки методом ионного обмена или жидкость-жидкостной экстракцией.

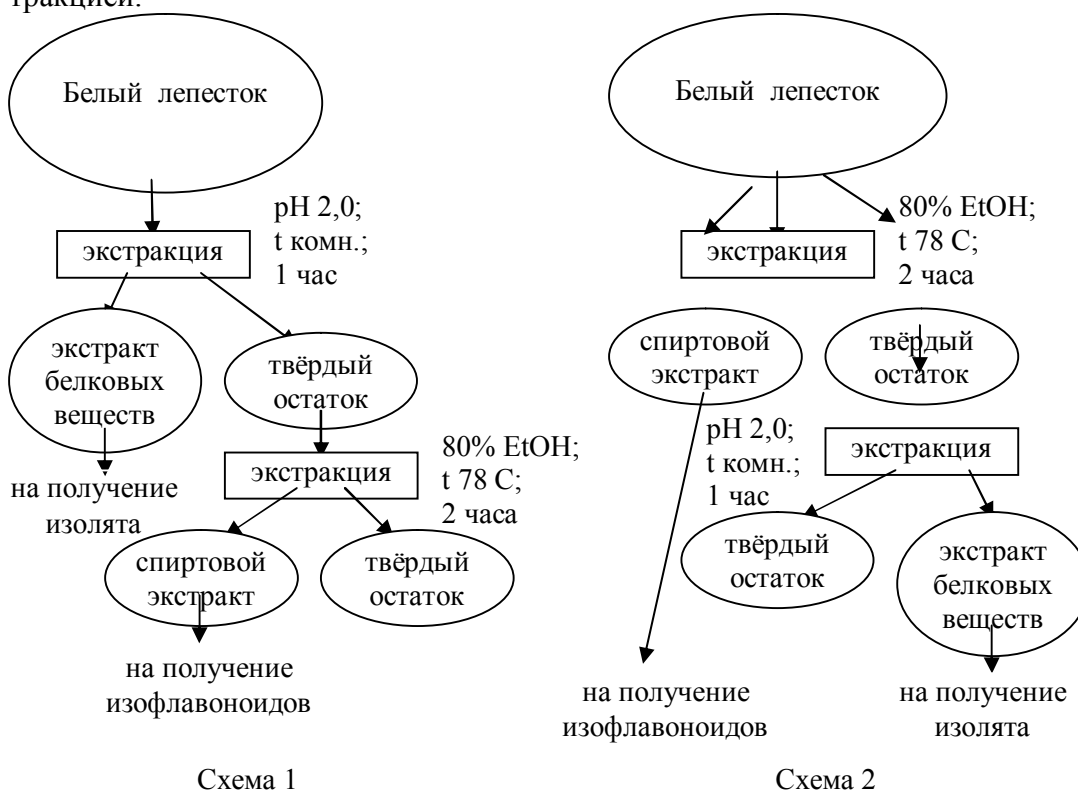


Рис. 1. Варианты принципиальных схем совместного получения соевых изофлавоноидов и изолята белка сои

Получаемый по данной схеме экстракт изофлавоноидов содержит большое количество белковых веществ. С целью очистки концентрата от белковых примесей нами были предложены методы ионного обмена и жидкость-жидкостной экстракции.

При проведении ионного обмена в качестве адсорбентов были выбраны катиониты фирмы *Purolite* марок С-106, С-145, С-150. Вначале был



исследован процесс ионного обмена в статических условиях. При проведении данного процесса было изучено влияние марки смолы и соотношения смола:экстракт на эффективность сорбции и десорбции. Также было установлено, что при проведении десорбции использование соляной кислоты в качестве элюента приводит к вымыванию белковых веществ, а этилового спирта — к вымыванию изофлавоноидов. Таким образом, для десорбции был выбран метод ступенчатой элюции, причем на первом этапе в качестве элюента использовалась 2М HCl, на втором — 80% этиловый спирт.

Согласно полученным данным, лучшим катионитом для очистки экстракта от белковых веществ является катионит С-150 в соотношении 2:1, так как для такого варианта наблюдается наилучшая сорбция (белковых веществ на 83 %, изофлавоноидов на 95 %). При проведении десорбции белковые вещества полностью вымываются из смолы, а изофлавоноиды десорбируются на 93 %.

На следующем этапе работы осуществлялся динамический ионный обмен при условиях, подобранных при проведении статического ионного обмена. Спиртовые фракции, обогащенные изофлавоноидами, после проведения ионного обмена не содержали белковых веществ. Результаты теста на острую токсичность с применением тест - культуры *Tetrachymena pyriformis*, проведенного после полной отгонки спирта из полученной фракции, показали, что она не обладает острой токсичностью.

При проведении очистки экстракта изофлавоноидов от белковых веществ методом жидкость-жидкостной экстракции в качестве органической фазы был выбран этилацетат, что было связано с хорошей растворимостью в нем изофлавоноидных соединений, в то время как белковые вещества являются водорастворимыми. Поэтому органическая фаза должна быть обогащена изофлавоноидами, водная — белковыми веществами.

На первом этапе исследований было изучено влияние соотношения органическая фаза:водная фаза на эффективность жидкость-жидкостной экстракции (водная фаза — экстракт изофлавоноидов). Было установлено, что наилучшие результаты получаются при соотношении органическая фаза:водная фаза, равном 3:1, при этом в органическую фазу переходит 87 % изофлавоноидов (от их исходного содержания в экстракте) и 61 % белковых веществ.

Однако, как можно видеть, данные условия не являются оптимальными, так как не наблюдается полного перехода изофлавоноидов в органическую фазу, а также часть белковых веществ также оказывается в этилацетате. Известно, что на процесс жидкость-жидкостной экстракции оказывают влияние такие параметры, как температура ведения процесса, рН исходного экстракта, время процесса, а также модифицирующие добавки — органические ко-растворители, способные менять полярность основного растворителя, позволяя, таким образом, подобрать оптимальные условия для разделения различных сложных систем [2].



При изучении влияния вышеописанных параметров на процесс жидкость-жидкостной экстракции было обнаружено, что время процесса мало влияет на его эффективность, поэтому было предложено ограничиваться проведением экстракции в течение получаса. Температура также не оказывает значительного влияния на процесс, хотя и наблюдается некоторое снижение эффективности разделения при повышении температуры, так что процесс целесообразно вести при комнатной температуре.

Наиболее значимым оказалось влияние таких факторов, как рН экстракта и добавление ко-растворителя. Было установлено, что процесс необходимо вести при рН около 2,0, так как в нейтральной области эффект разделения практически отсутствует, а в щелочной области процесс хотя и протекает, но значительно хуже, чем в кислой области.

В качестве ко-растворителей нами были выбраны такие органические соединения, как *n*-бутанол и изоамиловый спирт. Данные соединения обладают большей полярностью, чем чистый этилацетат, а изофлавоноидные соединения содержат гидроксильные группы, поэтому можно предположить, что увеличение полярности органической фазы приведет к более полному переходу изофлавоноидов в органическую фазу. Исследования показали, что наилучшими являются такие соотношения органических растворителей, как этилацетат:*n*-бутанол = 60:40 (по объему) и этилацетат:изоамиловый спирт = 70:30 (по объему).

Таким образом, оптимальными условиями очистки изофлавоноидного экстракта от белковых примесей являются время 30 минут, соотношение органическая фаза:водная фаза = 3:1, комнатная температура, рН исходного экстракта, равный 2,0 и следующие соотношения растворителей в органической фазе: этилацетат:*n*-бутанол = 60:40 (по объему) и этилацетат:изоамиловый спирт = 70:30 (по объему). После полной отгонки органических растворителей очищенные методом жидкость-жидкостной экстракции фракция изофлавоноидов были также проверена на острую токсичность с применением тест - культуры *Tetrachymena pyriformis*, результаты теста показали, что острая токсичность отсутствует.

Библиографические ссылки

1. Казаков А.Л. Природные и модифицированные изофлавоноиды [Текст] / А.Л.Казаков, В.П.Хиля, В.В.Межеричкий, Ю.Литкеи. // Изд-во Ростовского университета, 1985. 184 с.
2. Cheng-Yen Wu, Shih-Ming Lai. Preparative isolation of isolavones from defatted soy flakes [Text] / Cheng-Yen Wu, Shih-Ming Lai. // Journal of liquid chromatography & related technologies (2007). 30. PP. 1617-1640.
3. Devanand L. Luthria Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of isoflavones from soybean [Text] / Devanand L. Luthria, Ronita Biswas, Savithiry Natarajan. // Food Chemistry (2007).105. PP. 325-333.
4. Литвиненко В.И. Природные флавоноиды [Текст] / В.П. Георгиевский, Ф.Н. Конев// Технология и стандартизация лекарств, 1996.