

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Вершинина Юлия Сергеевна**

**Извлечение белка подсолнечника и контроль его качества на  
содержание фенольных соединений методами колебательной  
спектроскопии**

Специальность – 1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
д.х.н., доцент Веселова И.А.

**Москва – 2025**

# **Содержание**

Список использованных сокращений .....	5
Введение .....	7
Обзор литературы .....	13
Глава 1. Источники растительного белка .....	13
1.1 Бобовые культуры .....	14
1.2 Зерновые культуры.....	17
1.3 Масличные культуры.....	18
Глава 2. Характеристика белка подсолнечника и способы его извлечения.....	22
2.1 Общие сведения о подсолнечном шроте.....	22
2.2 Характеристика белка подсолнечного шрота.....	23
2.3 Технико-функциональные характеристики подсолнечного белка .....	25
2.4 Методы получения белковых концентратов и изолятов .....	27
Глава 3. Фенольные соединения подсолнечного шрота .....	30
3.1 Фенол-белковые взаимодействия .....	32
3.2 Способы очистки белков подсолнечника от фенольных соединений .....	37
Глава 4. Методы контроля качества сырья и конечных белковых продуктов .....	41
4.1 Методы определения белка .....	41
4.1.1 Азотометрические методы .....	41
4.1.2 Биохимические методы .....	42
4.2 Методы определения клетчатки .....	46
4.3 Методы определения фенольных соединений .....	46
4.3.1 Спектрофотометрические методы.....	46
4.3.2 Электрохимические методы .....	50
4.3.3 Хроматографические методы .....	52
Экспериментальная часть .....	56
Глава 5. Исходные вещества, посуда, аппаратура, обработка результатов измерений, методики эксперимента .....	56
5.1 Исходные вещества .....	56
5.2 Посуда и аппаратура .....	58
5.3 Методики эксперимента .....	59
5.3.1 Методики получения белка из подсолнечного шрота.....	59

5.3.2 Методики дополнительной очистки белка .....	61
5.3.3 Методики определения белка .....	61
5.3.4 Методики выделения фенольных соединений .....	64
5.3.5 Методики определения фенольных соединений методами спектрофотомерии .....	65
5.3.6 Методики определения фенольных соединений методом ВЭЖХ .....	66
5.3.7 Методика определения фенольных соединений методом ИК-спектроскопии .....	67
5.3.8 Методика определения фенольных соединений методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) .....	68
5.3.9 Методика определения фенольных соединений методом ГКР-спектроскопии .....	69
5.4 Обработка результатов .....	70
Обсуждение результатов.....	71
Глава 6. Разработка подхода к выделению белка из подсолнечного шрота.....	71
6.1 Выбор оптимальных условий извлечения белка и отделения нерастворимого осадка.....	71
6.2 Выбор условий выделения белка: сравнение эффективности осаждения и флотации .....	75
6.3 Выбор условий дополнительной очистки белка .....	78
6.4 Выделение фенольных соединений из водной фазы после стадии флотации	80
6.5 Схема получения белка из подсолнечного шрота.....	82
Глава 7. Методы контроля качества белка подсолнечного шрота.....	84
7.1 Методы определения белка .....	84
7.1.1 Азотометрические методы .....	84
7.1.2 Биохимические методы .....	86
7.2 Методы определения фенольных соединений .....	98
7.2.1 Спектрофотометрические методы.....	98
7.2.2 Определение фенольных соединений методом ВЭЖХ.....	100
7.2.3 Определение фенольных соединений методом ИК-спектроскопии.....	105
7.2.4 Определение фенольных соединений методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) .....	110

7.2.5 Определение фенольных соединений методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) .....	118
Заключение.....	121
Выводы .....	123
Список литературы.....	124

## **Список использованных сокращений**

БИК – ближняя инфракрасная область  
БЛ – берлинская лазурь  
БСА – бычий сывороточный альбумин  
БЦК – бицинхониновая кислота  
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография  
ГКР – гигантское комбинационное рассеяние  
ИК – инфракрасная  
ИЭТ – изоэлектрическая точка  
КР – комбинационное рассеяние  
КК – кофейная кислота  
НФ – неподвижная фаза  
ПФ – подвижная фаза  
СВЧ – сверхвысокие частоты  
СФЭ – сверхкритическая флюидная экстракция  
ТФЭ – твердофазная экстракция  
УЗ – ультразвук  
УФ – ультрафиолет  
ФЧ – Фолина-Чокальтеу  
ХГК – хлорогеновая кислота  
ХК – хинная кислота  
ЦТАБ – цетилtrimетиламмония  
АВТС – 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислоты)  
AgNP – наночастицы серебра  
АОА – общая антиоксидантная активность

DFT – теория функционала плотности

DPPH – 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил

MWNT – многослойные углеродные нанотрубки

PPO – полифенолоксидаза

SERS – поверхностно-усиленная рамановская спектроскопия

SFA – альбумин подсолнечника

TBA – тригидроксибензакридин

# **Введение**

## **Актуальность темы**

Одним из приоритетных направлений развития научно-технологического комплекса России, определяющих здоровье населения и сохранение его генофонда, является переход к высокопродуктивному и экологически чистому агро- и аквахозяйству, создание безопасных и качественных, в том числе функциональных, продуктов питания. Проблема качества, пищевой ценности и безопасности пищевых продуктов включает не только разработку перспективных технологий, но и усовершенствование существующих методов химического анализа, а также создание новых аналитических подходов контроля пищевых систем.

Подсолнечник является одной из наиболее ценных сельскохозяйственных культур, выращиваемых на территории Российской Федерации, и наиболее рентабельной масличной культурой. Подсолнечный шрот – важнейший вторичный продукт получения масла благодаря высокому содержанию сырого протеина (около 40%), отличающегося от других масличных культур в первую очередь сбалансированным аминокислотным составом и практически полным отсутствием антипитательных веществ.

Однако на сегодняшний день применение подсолнечного шрота в пищевой промышленности все еще ограничено. Одной из главных причин является наличие в нем фенольных соединений (1-4%), в основном хлорогеновой кислоты, которая в условиях высоких значений pH и температуры легко окисляется и необратимо связывается с молекулами белка, придавая темно-зеленое окрашивание и горьковатый вкус конечному продукту.

В связи с этим одной из ключевых целей Стратегии развития агропромышленного комплекса до 2030 года является создание новых технологий производства и переработки сельскохозяйственной продукции, а концепция «Цифрового сельского хозяйства» включает в себя разработку быстрых скрининговых методов контроля качества как исходного сырья, так и конечного целевого продукта. Методы колебательной спектроскопии, к которым относятся рамановская и ИК-спектроскопия, могут одновременно обеспечить недеструктивный, в ряде случаев дистанционный, мультиплексный скрининговый анализ при определении биологически активных веществ на разных стадиях

биотехнологического процесса без пробоподготовки объектов и привлечения высококвалифицированного персонала.

### **Цель работы**

Разработка эффективных подходов к выделению белка из подсолнечного шрота для получения изолятов высокой степени чистоты и контролю качества сырья и конечного белкового продукта на содержание фенольных соединений с помощью методов колебательной спектроскопии.

Для достижения поставленной цели были решены следующие **задачи**:

- предложить способ и выбрать оптимальные условия (рН водной фазы, гидромодуль, температура, время, состав органической фазы) извлечения белка из подсолнечного шрота;
- предложить подходы к предотвращению связывания молекул белка с продуктами окисления фенольных соединений, содержащихся в исходном сырье, в условиях высоких значения рН и температуры;
- предложить подходы к увеличению степени извлечения белка по сравнению с существующими способами и повысить степень чистоты конечного белкового продукта;
- сравнить возможности различных классических методов определения белка (азотометрических, спектрофотометрических) с учетом матрицы исследуемого растительного объекта;
- разработать подходы к недеструктивному анализу сырья и конечного белкового продукта на содержание фенольных соединений методами ИК-, КР и ГКР спектроскопии.

### **Научная новизна**

Разработан новый эффективный способ извлечения белка из шрота подсолнечника и последующего его отделения от маточного раствора в присутствии органических растворителей методом флотации, который позволил значительно повысить степень извлечения (в среднем в 1.5 раза больше по сравнению с литературными данными) целевого вещества до (94±1) %.

Сочетание предложенного способа выделения белка с очисткой продукта методом сверхкритической флюидной СО<sub>2</sub>-экстракции позволило получить изолят из шрота подсолнечника с чистотой (96±1) % и значительно сократить количество

солевых отходов (не менее, чем в 40 раз по сравнению с литературными сведениями).

Для получения белковых препаратов, не связанных с продуктами трансформации фенольных соединений, при извлечении белка раствором аммиака предложено внесение в реакционную систему антиоксиданта (бисульфита натрия), который предотвращает окисление указанных соединений кислородом воздуха в условиях высоких значений pH.

Разработан подход для определения общего количества белка в шроте и белковых препаратах подсолнечника, основанный на сочетании автоматизированного и экспрессного азотометрического метода Дюма в tandemе со спектрофотометрической методом Лоури для подтверждения белковой природы азота в реальном образце.

Разработан и апробирован на реальном объекте подход к недеструктивному анализу сырья и конечного белкового продукта на содержание фенольных соединений методами КР и ИК-спектроскопии.

Предложена ГКР сенсорная система на основе медной фольги, модифицированной наночастицами серебра, для экспрессного определения хлорогеновой и кофейной кислот в объектах с белковой матрицей.

### **Практическая значимость**

Разработан лабораторный способ выделения белка из подсолнечного шрота методом флотации, который был масштабирован в 25 раз и апробирован на pilotной установке в инновационном центре ООО «Бирюч-НТ».

Разработана методика определения протеина в подсолнечном шроте с использованием автоматизированного и экспрессного азотометрического метода Дюма в tandemе со спектрофотометрическим методом Лоури для подтверждения белковой природы азота.

Разработана методика определения основного фенольного соединения подсолнечного шрота (хлорогеновой кислоты) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием, которую можно использовать в качестве «золотого стандарта» для контроля содержания этого соединения на всех стадиях технологического процесса.

Предложена и апробирована методика определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом ИК-спектроскопии.

Предложена и апробирована ГКР-сенсорная система для экспрессного определения хлорогеновой и кофейной кислот в объектах с белковой матрицей.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Извлечение белка из подсолнечного шрота водным раствором аммиака позволяет увеличить степень извлечения и сократить в 40 раз количество солевых отходов, а внесение в реакционную систему антиоксиданта (бисульфита натрия) обеспечивает получение чистых белковых препаратов, не связанных с продуктами трансформации фенольных соединений.

2. Способ выделения подсолнечного белка из маточного раствора с использованием органического растворителя (нефраса), а также выбор оптимальных значений pH маточного раствора и соотношения фаз обеспечивает выход белкового препарата более 90 масс.%, а применение сверхкритической флюидной CO<sub>2</sub>-экстракции в качестве дополнительной стадии очистки белка дает возможность получать изоляты высокой степени чистоты – (96±1) масс.%.

3. Предложенный подход, основанный на автоматизированном и экспрессном азотометрическом методе Дюма в tandemе со спектрофотометрическим методом Лоури, позволяет определять содержание протеина как в подсолнечном шроте, так и в извлекаемом из него белковом препарате.

4. Разработанная методика определения основного фенольного соединения подсолнечного шрота (хлорогеновой кислоты) методом ВЭЖХ с УФ-детектированием применима в качестве «золотого стандарта» для контроля содержания данного фенольного соединения на всех стадиях технологического процесса выделения белка из подсолнечного шрота.

5. Разработанная методика на основе метода ИК-спектроскопии обеспечивает недеструктивный анализ подсолнечного шрота на содержание хлорогеновой кислоты в диапазоне концентраций 0.5–10 мг/г, а предложенная методика на основе спектроскопии ГКР позволяет проводить экспрессное определение хлорогеновой и кофейной кислот в объектах с белковой матрицей в диапазоне концентраций 70-350 мкг/г и 36-180 мкг/г, соответственно.

### **Степень достоверности**

Полученные в ходе работы результаты подтверждались большим объемом экспериментальных данных, осуществлением обработки полученных результатов

методами математической статистики, применением современного спектрофотометрического, спектроскопического и хроматографического оборудования.

### **Соответствие паспорту научной специальности**

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 1.4.2. Аналитическая химия по областям исследований: методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.); методы маскирования, разделения и концентрирования; анализ объектов окружающей среды; анализ пищевых продуктов.

### **Апробация результатов исследования**

Основные результаты работы представлены на следующих конференциях:

**2025 год:** конференция «Оптические хемо- и биосенсоры», Саратов, Россия, 30 сентября – 2 октября 2025; XVIII Всероссийская конференция «Высокочистые вещества. Получение, анализ, применение», Нижний Новгород, Россия 8-10 сентября 2025;

**2024 год:** XXII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии, Федеральная территория «Сириус», Россия, 7-11 октября 2024; XXVII Всероссийская конференция молодых ученых-химиков, Нижний Новгород, Россия 16-18 апреля 2024; XXXI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2024», Москва, Россия, 12-26 апреля 2024.

**2023 год:** II Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Ресурсосберегающие и экологобезопасные процессы в химии и химической технологии», Пермь, Россия, 21-24 ноября 2023; XXX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2023», Москва, Россия, 10-21 апреля 2023.

**2022 год:** XXIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2022», Москва, Россия, 11-22 апреля 2022.

**2021 год:** XXVIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2021», Москва, Россия, 12-23 апреля 2021.

## **Публикации**

По материалам работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных (Web of Science, Scopus, RSCI) и рекомендованных в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.2. Аналитическая химия.

## **Личный вклад автора**

Результаты исследований получены лично автором, под его руководством или в сотрудничестве с коллегами. Личный вклад автора заключался в поиске, систематизации и анализе литературных данных по теме работы, а также подготовке, планирования и проведения экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке материалов к публикации и представлении на конференциях. Образцы подсолнечного шрота предоставлены инновационным центром ООО «Бирюч-НТ». Сверхкритическая флюидная CO<sub>2</sub>-экстракция осуществлена инженером ИНЭОС РАН Стамер Е.С., CHN-анализ образцов сырья и белковых продуктов выполнил к.х.н., м.н.с. МГУ им. М.В. Ломоносова Гармай А.В. Помощь с предоставлением оборудования и реактивов для проведения электрофореза оказал к.б.н., проектный менеджер ООО «Хайтест» Семенов А.Г. Моделирование колебательных спектров выполнила к.х.н., м.н.с. МГУ им. М.В. Ломоносова Еремина О.Е.

## **Структура и объем работы**

Работа имеет следующую структуру: список использованных сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальная часть, результаты и их обсуждение (представлены в двух главах), заключение, список использованной литературы. Работа изложена на 141 странице, включая 55 рисунков и 34 таблицы. В списке литературы 198 наименований.

# **Обзор литературы**

## **Глава 1. Источники растительного белка**

В последние годы популярность растительных источников белка демонстрирует значительный рост. Эта тенденция связана с увеличением численности населения и, как следствие, повышением глобального спроса на белок. Кроме того, растет уровень осведомленности потребителей в области пищевых ингредиентов, а также их интерес к натуральным, экологически чистым и устойчивым источникам пищевых продуктов [1].

Одной из перспективных идей в области питания человека является частичная замена белков животного происхождения на растительные белки. Считается, что такое изменение поможет сделать производство продуктов питания более устойчивым, что, в свою очередь, поможет сохранить экологическое благополучие планеты [2].

Согласно исследованиям, белки из растительных источников неполноценны, так как в них не хватает некоторых незаменимых аминокислот. Например, аминокислотный профиль белков зерновых культур характеризуется дефицитом лизина, а бобовых – метионина, цистина и триптофана [3]. Хотя диеты на основе белков растительного происхождения не могут полностью заменить мясные продукты, они обладают широким спектром полезных для организма человека свойств. В частности, растительные белки не содержат холестерина, в то время как многочисленные исследования указывают на потенциальную связь между высоким потреблением белков животного происхождения и проблемами со здоровьем [4].

Интерес к развитию альтернативных источников белка связан не только с возможностью обеспечения потребителей разнообразными продуктами питания, но и с необходимостью решения проблем экологической устойчивости [5]. Животноводство вносит значительный вклад в изменение климата. Огромное потребление водных ресурсов приводит к истощению пресной воды, а выбросы парниковых газов – к глобальному потеплению. Кроме того, животноводство неэффективно использует ценные земельные ресурсы, поскольку значительные площади сельскохозяйственных угодий отводятся под производство кормов для скота, а не непосредственно для питания людей [6].

Таким образом, в поисках альтернативных решений для удовлетворения растущих потребностей населения в белке все больше внимания уделяется замене белка животного происхождения на растительные аналоги. Так, в последние годы ускорилась разработка новых аналогов мяса, а некоторые из наиболее перспективных альтернатив основаны на белках из растительных источников, таких как соя и горох. Кроме того, расширился рынок заменителей молочных продуктов. При этом правильное сочетание растительных белков может обеспечить поступление достаточного количества незаменимых аминокислот, необходимых для организма человека. Ключевыми источниками растительного белка в настоящее время являются бобовые, зерновые и масличные (рапс, лен, подсолнечник) культуры [7].

## **1.1 Бобовые культуры**

Бобовые культуры (соя, горох, нут, чечевица) обладают рядом экологических преимуществ: минимальная потребность в удобрениях, низкий углеродный след и пищевые отходы, низкая себестоимость [8]. Кроме того, бобовые являются богатым источником биологически активных соединений, таких как полифенолы и пищевые волокна [9].

Бобовые богаты белком (20-25%), обладающим ценными питательными и функциональными свойствами (растворимость, способность к эмульгированию и пенообразованию). Они также содержат и антипитательные вещества (ингибиторы ферментов, фитиновую кислоту, танины, оксалаты, сапонины), которые могут оказывать нежелательное воздействие усвоение белка и здоровье человека [10]. Однако в ходе технологического процесса предварительной обработки (дегидрирования, вымачивания, варки и т.д.) содержание этих соединений, как правило, снижается [11].

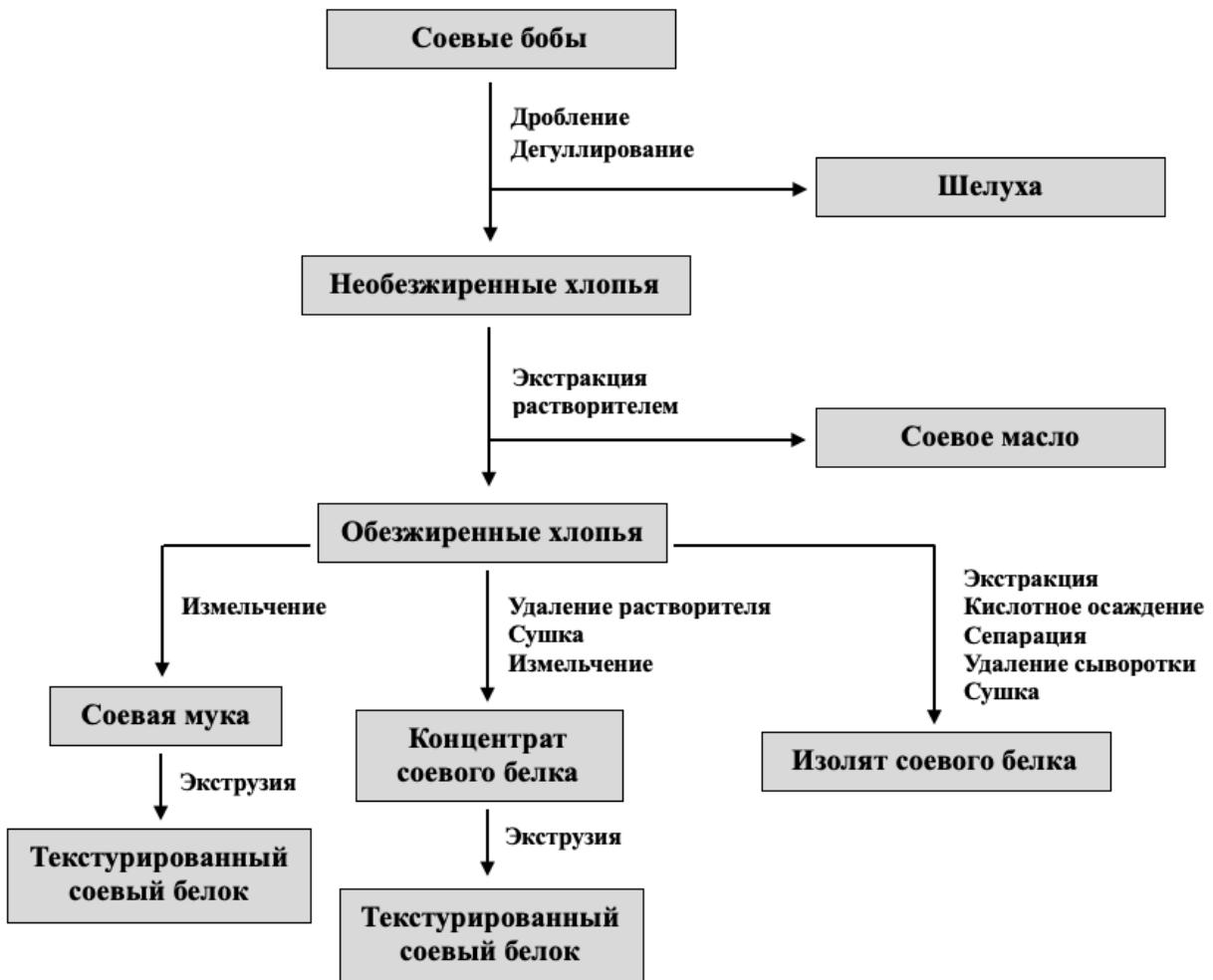
**Соя**, относящаяся к числу важнейших сельскохозяйственных культур, как источник растительного масла занимает второе место в мире. Бобы сои включают в себя около 35-40% сырого протеина, 20% липидов, 9% пищевых волокон и 8.5% влаги [12]. Благодаря высокому содержанию белка большая часть обезжиренного соевого шрота используется в качестве корма для животных, а небольшая часть перерабатывается в различные виды соевых белковых продуктов для потребления человеком [13]. Сбалансированный аминокислотный состав делают сою важным

источником растительного белка, обладающим большим потенциалом для замены белков животного происхождения в рационе человека [7].

В соевом белке присутствуют две основные фракции: 7S ( $\beta$ -конглицинин) и 11S (глицинин) глобулины, составляющие около 80-90% всех протеинов [12]. Kitamura K. в своей работе [14] сообщает, что глицинин содержит больше таких незаменимых аминокислот, как метионин и цистеин, чем  $\beta$ -конглицинина, а в статье Yamauchi F. и др. [15] утверждается, что глицинин является лучшим гелеобразователем, а  $\beta$ -конглицинин проявляет более сильные эмульгирующие свойства, чем глицинин.

Однако именно глицинин и  $\beta$ -конглицинин являются наиболее изученными аллергенными белками сои. Кроме того, к антипитательным факторам относят соевый агглютинин и ингибиторы протеазы сои [16]. Соевый агглютинин – это гликопротеин с молекулярной массой около 120 кДа, который может привести к плохому усвоению пищи и ухудшению роста, а ингибиторы протеазы сои могут подавлять активность трипсина или одновременно трипсина и химотрипсина [17]. В связи с этим необходимы дополнительные исследования для установления, какие антипитательные компоненты сои способны причинить вред здоровью человека после термической обработки или других технологических приемов.

Основными продуктами, производимыми из сои, являются соевая мука, концентрат и изолят соевого белка, текстурированные и гидролизованные соевые белки. На **рисунке 1** представлена принципиальная блок-схема извлечения и переработки соевого белка. Концентрат соевого белка, который производится из обезжиренных соевых хлопьев после удаления большей части растворимых соединений клеточной стенки, содержит более 65% сырого протеина. Наиболее очищенной формой соевого белка является изолят (более 90% сырого протеина), получаемый посредством щелочной экстракции и последующего осаждения в изоэлектрической точке [7].



**Рисунок 1.** Блок-схема технологического процесса извлечения и переработки белка из соевых бобов [7].

Семена *гороха* содержат около 20-25% протеина, 40-50% крахмала и 10-20% клетчатки [7]. К второстепенным компонентам относятся витамины, минералы, сапонины, фитиновая кислота, полифенольные соединения и витамины группы В. Гороховый белок считается высококачественным растительным белком и функциональным ингредиентом в пищевой промышленности благодаря своей низкой аллергенности, высокому содержанию протеина, дешевизне и доступности культуры. Кроме того, гороховый белок обладает отличными функциональными свойствами, такими как растворимость, водо- и маслоудерживающая способность, способность к эмульгированию, гелеобразованию и вязкость [18].

Изолят горохового белка в основном из глобулинов – легуминов (11S), вицилинов (7S) и конвицилинов (8S) и водорастворимых альбуминов. Остальные белки гороха (проламин и глютелин) обычно присутствуют в незначительных количествах (~5 масс.%) [19]. При этом вицилин и конвицилин являются

потенциально аллергенными белками [20]. Тем не менее, они могут быть дезактивированы во время тепловой обработки и ферментативного переваривания в желудочно-кишечном тракте [8].

Гороховый белок имеет хорошо сбалансированный аминокислотный профиль, содержащий большое количество лизина [6]. Глобулины гороха, как правило, содержат много аргинина, фенилаланина, лейцина и изолейцина, в то время как альбуминовая фракция отличается высоким содержанием триптофана, лизина и треонина [20].

Z. Ma и др. в работе [21] использовали гороховый белок в качестве эмульгатора для замены яичного желтка в салатных заправках. Авторы показали, что изолят белка гороха можно использовать для производства салатных заправок с физическими свойствами, аналогичными коммерческим заправкам на основе яиц. K. Shevkani и N. Singh [22] установили, что гороховый белок подходит для приготовления безглютеновых кексов, по характеристикам сопоставимых с кексами из пшеничной муки.

## 1.2 Зерновые культуры

Зерновые – самая важная группа культур с точки зрения общего производства и вклада в рацион питания человека. По данным FAO (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) в период 2019-2021 годов общее годовое производство всех зерновых составило более 3000 млн тонн, причем почти 90% от этого объема пришлось на три культуры: кукурузу (около 1170 млн тонн), рис (около 770 млн тонн) и пшеницу (около 764 млн тонн). Хотя белки семян зерновых являются частью рациона человека на протяжении тысячелетий, спрос на продукты питания из растительных источников приводит к увеличению их потребления, как в традиционном виде, так и после обработки с целью имитации продуктов на основе животных белков [23].

Кроме того, все больший интерес вызывают белки псевдозерновых. По содержанию протеина превдозерновые превосходят практически все зерновые и сравнимы с такими бобовыми, как соя и фасоль (**таблица 1**). Амарант, киноа и гречка рекомендованы Всемирной гастроэнтерологической организацией для больных целиакией, так как они не содержат глютен. Кроме того, все эти безглютеновые злаки рекомендуются в качестве базовых ингредиентов для

использования в производстве детского питания как альтернатива рису из-за их низкой аллергенности [24].

**Таблица 1.** Содержание протеина в зерновых и псевдозерновых культурах [25]

Культура	Содержание протеина, %
Пшеница	8.0-17.5
Кукуруза	8.8-11.9
Рис	6.6-8.4
Ячмень	7.0-14.6
Овес	8.7-16.0
Рожь	8.0-17.7
Гречиха	21.6-25.3
Амарант	11.7-18.4
Киноа	13.0-14.0

Помимо белка зерновые также являются богатым источником полифенольных соединений, кальция, пищевых волокон, липидов, и крахмала. Рисовый белок считается очень ценным благодаря высокому содержанию незаменимых аминокислот, а также гипохолестеринемическим (снижает уровень холестерина в крови) и гипоаллергенным (снижает риск возникновения аллергических реакций) свойствам [26]. Gamel T.H. и др. [27] сообщили, что амарант и киноа являются хорошими источниками рибофлавина, витамина С и, в особенности, фолиевой кислоты и витамина Е.

### **1.3 Масличные культуры**

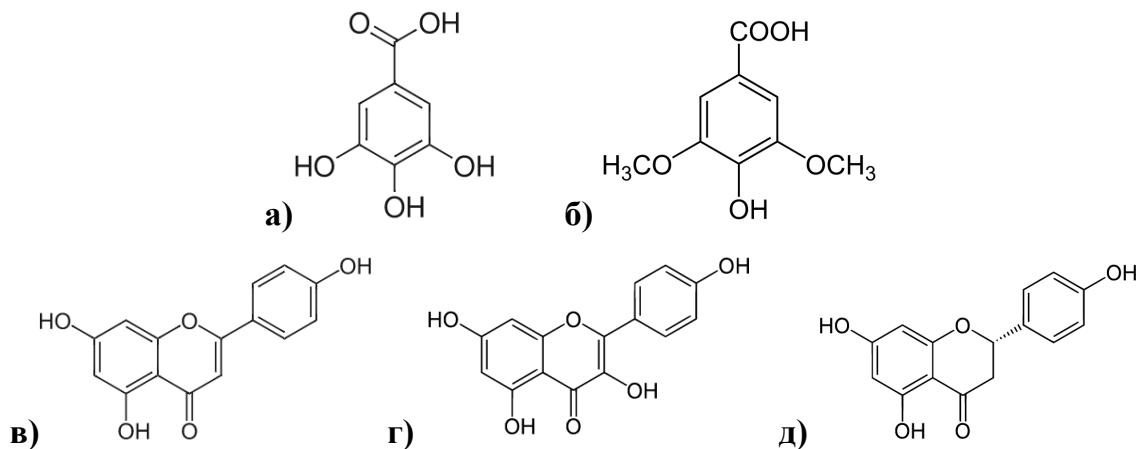
Содержание белка в обезжиренном шроте масличных культур зависит от вида семян и составляет от 35 до 60% (в пересчете на сухое вещество). При этом шроты содержат антипитательные соединения, такие как олигосахариды, ингибиторы трипсина, фитиновую кислоту, танины, и обладают низкой растворимостью белка, что может ограничить применение в пищевых целях [28].

*Rapс*, являясь второй по объему производства масличной культурой в мире, обладает высоким потенциалом в качестве источника растительного белка, что обусловлено его высокой питательной ценностью и технико-функциональными свойствами. В настоящее время побочные продукты производства рапсового масла

(обезжиренный шрот и жмых) находят основное применение в качестве кормовой базы в животноводстве и птицеводстве. При этом, до сих пор нет сведений об использовании рапса как источника пищевых ингредиентов в промышленных масштабах, хотя он содержит от 17 до 28% сырого протеина, способного удовлетворить потребности человека в заменимых и незаменимых аминокислотах [29].

Преобладающими белками рапса являются 11S глобулины (круциферин) и 2S альбумин (напин) с молекулярными массами 300-350 кДа и 12-16 кДа, соответственно [2]. Согласно Akbari и Wu, выделение белка из рапса представляется сложной задачей. Это связано в основном с широким спектром протеинов, обладающих различными свойствами, а также с наличием антипитательных веществ, в числе которых глюкозинолаты, фенольные соединения (синапин и конденсированные танины), фитаты и клетчатку [30].

Согласно исследованию Oskoueian и др. [31], в состав рапсового шрота входят такие фенольные соединения, как галловая и сириングовая кислоты, а также флавоноидов – апигенина, кемпферола и наингенина (**рисунок 2**). Guo Y. и др. [32] выяснили, что синапин оказывает положительный эффект на состояние организма человека благодаря своим антиоксидантным, противоопухолевым и антимутагенным свойствам.



**Рисунок 2.** Структурные формулы а) галловой и б) сириングовой кислот, в) апигенина, г) кемпферола, д) наингенина.

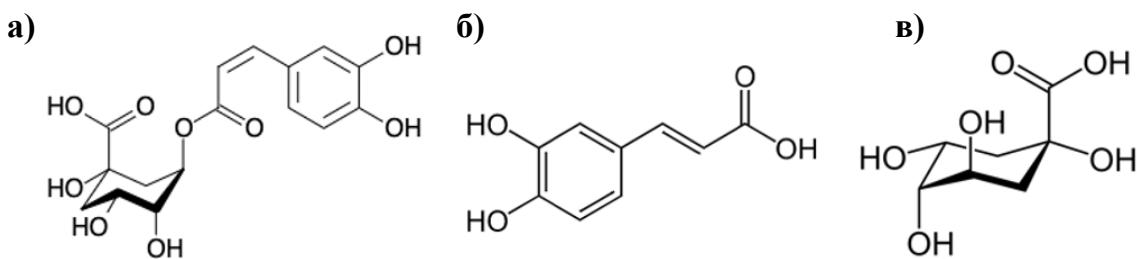
Однако несмотря на полезные свойства именно фенольные соединения в рапсовом шроте отвечают за темный цвет, вяжущий и горький вкус, в связи с чем

возможности его использования как белковой добавки в пищевой промышленности имеет ряд ограничений [32].

Среди масличных культур **подсолнечник** занимает третье место в мире по валовому сбору, четвертое место по объемам производимого из него масла и третье – по производству масличного шрота среди других источников белка. Одним из побочных продуктов процесса извлечения масла является подсолнечный шрот, который имеет высокое содержание сырого протеина (40-50%), что делает его привлекательным источником растительного белка [33].

Белок подсолнечного шрота не содержит антипитательных компонентов (таких как ингибиторы протеаз, цианогены и глюкозинолаты), а его аминокислотный состав, за исключением лизина, соответствует стандарту FAO (Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) [34]. Кроме того, такой белок на 70-85% состоит из 11S-глобулинов (Helianthinin) и 2S-альбуминов (SFA) и, следовательно, обладает хорошей растворимостью, что открывает широкие возможности для его использования в качестве пищевого ингредиента [33].

Подсолнечный шрот содержит значительное количество кальция, фосфора и витаминов группы В, таких как никотиновая кислота, тиамин, пантотеновая кислота, рибофлавин и биотин [35]. Кроме того, подсолнечник богат фенольными соединениями (1-4 масс.-%), 70% которых составляют хлорогеновая, кофейная и хинная кислоты (рисунок 3). Остальными полифенолами являются п-гидроксибензойная, м-гидроксибензойная, п-кумаровая, коричная, ванилиновая и сирингиновая кислоты [36].



**Рисунок 3.** Структурные формулы а) хлорогеновой кислоты, б) кофейной кислоты, в) хинной кислоты.

Однако высокое содержание полифенолов в подсолнечном шроте, несмотря на их потенциальную пользу для здоровья человека, сдерживает широкое

применение данного растительного сырья в качестве источника пищевого белка. Фенольные соединения, в частности, хлорогеновая кислота, образуют комплексы с белками, снижая их перевариваемость и усвояемость [33].

## Глава 2. Характеристика белка подсолнечника и способы его извлечения

### 2.1 Общие сведения о подсолнечном шроте

Несмотря на богатство питательных веществ, остатки масличных культур обычно утилизируются или используются в качестве корма для домашних животных. Однако они могут стать богатым и экономически выгодным источником белка для потребления человеком. Белок подсолнечного шрота является одним из наиболее перспективных белков масличных культур благодаря его широкой доступности, высокому содержанию протеина и относительно низкой стоимости [37]. В 2023 году мировое производство подсолнечного шрота составило рекордные 22.3 млн тонн и имеет тенденцию к росту (**рисунок 4**) [38].



**Рисунок 4.** Мировое производство подсолнечного шрота за 2021-2023 год.

Подсолнечный шрот содержит до 50% легкоусвояемого протеина (в зависимости от эффективности дегулирования и степени извлечения масла), который не содержит антипитательных компонентов (таких как ингибиторы протеаз, цианогены и глюкозинолаты) и имеет хорошо сбалансированный аминокислотный состав, близкий к идеальному [39]. Кроме того, шрот подсолнечника содержит около 23% клетчатки, фосфор, витамины группы В (тиамин, рибофлавин, холин и др.), токоферол, и другие минеральные вещества. Подробный химический состав представлен в **таблице 2** [33].

**Таблица 2.** Химический состав и питательная ценность подсолнечного шрота (в пересчете на 1 кг)

Показатели	Значение	Показатели	Значение
Кормовые единицы, кг	1.03	Магний, г	5.1
Сухое вещество, г	90	Натрий, г	3.3
Сырой протеин, г	429	Железо, г	332
Лизин, г	14.2	Медь, мг	24.1
Метионин+цистин, г	16.7	Цинк, мг	40.8
Сырая клетчатка, г	144	Марганец, мг	48.5
Крахмал, г	28	Кобальт, мг	0.42
Сахара, г	52.6	Йод, мг	0.66
Биологические экстрактивные вещества (БЭВ), г	224	Витамин D (кальциферол), тыс. МЕ	5
Сырой жир, г	37	Витамин Е (токоферол), мг	3
Кальций, г	3.6	Витамин В1 (тиамин), мг	7
Калий, г	8	Витамин В2 (рибофлавин), мг	3
Фосфор, г	12.2	Витамин В4 (холин), мг	2200
Витамин В3 (пантотеновая кислота), мг	13	Витамин В5 (никотиновая кислота), мг	159.5
Переваримый протеин, г	389	Каротин, мг	3

## 2.2 Характеристика белка подсолнечного шрота

Несмотря на существующие недостатки, все чаще рассматривается возможность применения белка подсолнечного шрота в качестве пищевой добавки, в частности, для обогащения хлебобулочных изделий. Благодаря своему аминокислотному составу (**таблица 3**) этот растительный белок служит ценным источником как незаменимых, так и заменимых аминокислот [33].

**Таблица 3.** Сравнение аминокислотного профиля белков подсолнечного шрота и сои [40].

Аминокислота	Содержание, г/100 г белка	
	Белок подсолнечного шрота	Соевый белок
<i>Незаменимые аминокислоты</i>		
Валин	7.9-8.6	3.9-10.0
Лейцин	5.6-6.2	6.7-9.8
Изолейцин	2.6-3.2	4.3-6.7
Лизин	2.0-2.4	1.3-7.8
Метионин	0.6-2.2	1.1-2.8
Треонин	2.3-3.3	2.3-4.4
Триптофан	0.9-1.2	1.1-4.8
Фенилаланин	3.0-3.5	2.4-9.7
<i>Заменимые аминокислоты</i>		
Аланин	5.0-5.5	3.0-4.5
Аргинин	8.5-9.6	6.7-9.4
Аспарагиновая кислота	9.8-10.5	4.9-12.0
Гистидин	3.1-3.4	2.3-8.8
Глицин	4.9-8.3	3.9-7.6
Глутаминовая кислота	25.4-26.9	13.7-17.7
Пролин	5.1-5.7	2.7-6.6
Серин	4.5-5.3	3.3-5.7
Тирозин	1.3-1.8	2.2-4.5
Цистеин	0.4-0.9	0.8-0.9

В отличие от других растительных протеинов аминокислотный состав подсолнечного шрота характеризуется высоким содержанием почти всех заменимых аминокислот и лишь незначительно дефицитен по лизину и треонину.

Глобально, белки часто классифицируют в соответствии со схемой Осборна [41] на глобулины (растворимы в солевых растворах), альбумины (растворимы в воде), проламины (растворимы в спирте), и глютелины (растворимы в щелочных растворах). Согласно этой классификации основными белками подсолнечника

являются глобулины (40-90%) и альбумины (10-30%), а глютелины и проламины являются лишь незначительными фракциями. Согласно еще одной классификация белков – по коэффициенту седиментации – белки подсолнечника разделяют на 11S-глобулины (*Helianthinin*) и 2S-альбумины (SFA) [33].

*Гелиантинин (helianthinin)* представляет собой глобулярный олигомерный белок с молекулярной массой 300-350 кДа. Наиболее принятая в настоящее время модель гелиантинина (11S) при нейтральном рН представляет собой шесть сферических субъединиц, расположенных в тригональной антипризме [9]. В условиях, обычно используемых для выделения белков (щелочные значения рН), гелиантинин присутствует в основном в 11S-форме, поэтому в литературе принято называть 11S-структуру молекулой гелиантинина. Однако, в зависимости от рН, ионной силы, температуры и концентрации белка, гелиантинин может также находиться в формах 15-18S, 7S или 3S [33].

*Подсолнечные альбумины (SFAs)* – это белки с молекулярной массой от 10 до 18 кДа [137-141]. Выделяют два типа: метионин-богатые и метионин-бедные альбумины. В отличие от 2S-альбуминов семян других видов, состоящих из двух цепей, соединенных дисульфидными связями, подсолнечные альбумины состоят из одной полипептидной цепи [33].

Белок подсолнечного шрота может проявлять хорошие технико-функциональные характеристики (эмульгирующие, пенообразующие, желирующие и связывающие свойства), которые делают его пригодными для включения в пищевые рецептуры, особенно в продукты нового поколения на растительной основе [42].

### **2.3 Технико-функциональные характеристики подсолнечного белка**

Способность белков стабилизировать пищевые системы зависит от таких характеристик, как растворимость, эмульгирующая способность, гелеобразование и пенообразование. Именно эти параметры определяют текстуру, стабильность, срок хранения и органолептические свойства белковых продуктов. На функциональные характеристики белков влияет их структура, аминокислотный состав, заряд, соотношение и распределение гидрофобных и гидрофильных субъединиц, а также физические факторы: рН и ионная сила [43].

**Растворимость** белка является определяющим условием его функциональности. На взаимодействие белка с водой, а также его влагоудерживающую способность влияет конфигурация белковой молекулы, количество заряженных группы, концентрация, pH и ионная сила. С ростом растворимости увеличивается вязкость, способность к эмульгированию, пенообразованию и гелеобразованию [44].

В большинстве исследований максимальная растворимость подсолнечного белка наблюдается в диапазоне pH 8-12, при этом наилучшей растворимостью альбумины обладают при pH около 2 [45, 46]. Однако ряд исследований [47, 48] указывает на повышение растворимости белка в кислой среде при увеличении концентрации хлорида натрия. Также известно, что наличие фенольных соединений снижает растворимость белков. При этом в ряде исследований установлено, что дефенолизация приводит к еще большему ухудшению растворимости [49, 50], в связи с чем до сих пор не установлено истинное влияние фенольных соединений на растворимость белка подсолнечного шрота.

Подсолнечный белок обладает выдающейся *эмульгирующей способностью*, что позволяет использовать его в пищевой промышленности в качестве альтернативы другим эмульгаторам [43]. В независимых исследованиях Lin и др. [51] и Sosulski и Fleming [52] при сравнении эмульгирующих свойств подсолнечного и соевого протеина пришли к выводу, что белок подсолнечника эмульгирует масло лучше, чем соевый белок.

Salgado и др. [53] изучали влияние pH и ионной силы на эмульгирующую способность белков подсолнечного шрота и выяснили, что оптимальная эмульгирующая активность и стабильность наблюдаются при pH около 3 и при добавлении 80 mM NaCl. Кроме того, Pickardt и др. [54] установили, что подсолнечный альбумин обладает более высокой эмульгирующей способностью, гелиантинин.

**Гелеобразующая способность** белков влияет на реологические свойства некоторых пищевых продуктов, которые являются важными показателями качества. Белки образуют гель благодаря трехмерной сети межмолекулярных взаимодействий. Известно, что степень удаления фенольных соединений влияет на способность белков к образованию геля [43]. Malik и Saini [55] выяснили, что в

присутствии фенольных соединений образуются менее эластичные гели с более высокой вязкостью.

Еще один показатель, влияющий на гелеобразование – pH. Sanchez и Burgos [56] сообщили, что качество гелевых структур белка подсолнечника увеличивается с ростом концентрации, температуры и времени термической обработки.

**Пенообразующая способность** различных фракций подсолнечного белка может отличаться. Так, альбумины обладают более высокой способностью к пенообразованию и образуют более стабильную пену, чем глобулины [54]. pH также оказывает значительно влияние на пенообразующую способность белков: согласно Salgado и др. [53] максимальная стабильность пены подсолнечного белка наблюдается в диапазоне pH 7-9.

Белок подсолнечного шрота является перспективной альтернативой пенообразователям на растительной основе. В недавних работах [57] и [58] обнаружено, что подсолнечный белок обладает лучшей пенообразующей способностью и стабильностью по сравнению с соевым белком.

Технико-функциональные свойства подсолнечного белка активно изучаются в течение последних десятилетий, а обзор результатов показывает, что подсолнечный шрот является перспективным альтернативным источником белка для создания структуры и стабилизации сложных пищевых систем.

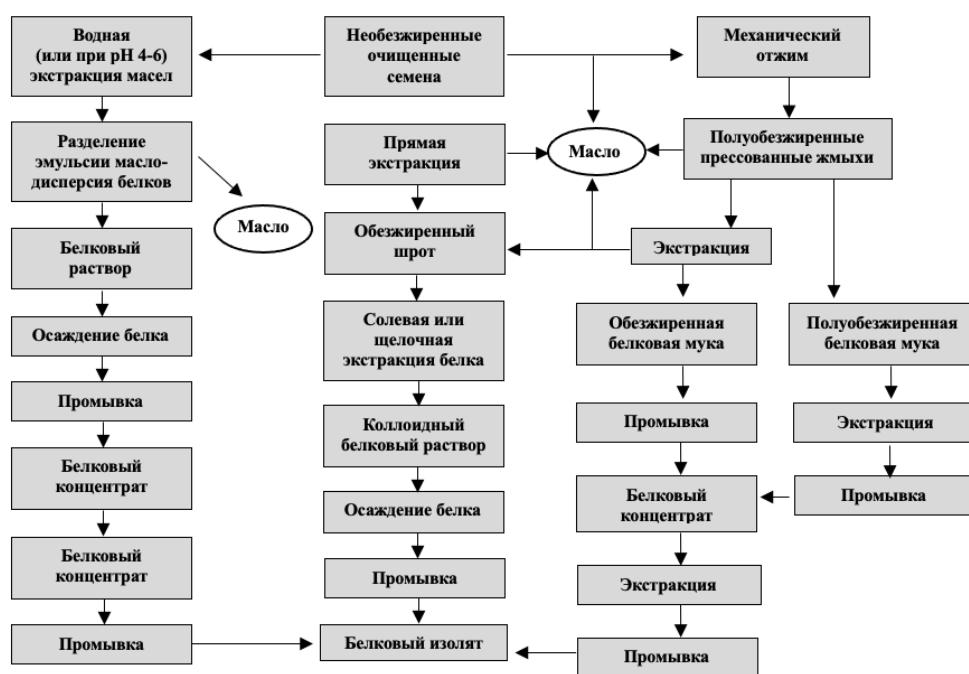
## **2.4 Методы получения белковых концентратов и изолятов**

В настоящее время белок из масличных семян и продуктов их переработки получают двумя основными способами. «Сухой» способ, или турбосепарация, заключается в выделении сырого протеина из измельченного сырья с его последующим фракционированием в воздушном потоке [59]. Основными недостатками данного метода является низкий выход белка и большое содержание клетчатки в конечном белковом продукте, что снижает его питательную ценность [60]. Вторым и наиболее распространенным способом получения белка является «мокрый» способ. Он заключается в экстракция белка из продуктов переработки семян подсолнечника – шротов и жмыхов. В зависимости от степени чистоты конечные продукта классифицируют на белковые концентраты (65-90% белка) и изоляты (90-95% белка) [61].

По классической технологии получение концентратов начинают с очищения и измельчения семян, после чего их смешивают с водой для образования белковой дисперсии. Затем дисперсию разделяют, а из образовавшегося экстракта осаждают белок [62]. Современные способы получения изолятов основаны на экстракции белка щелочным раствором и последующее его осаждение в изоэлектрической точке с помощью кислоты [59].

W. Neumuller [63] разработал способ выделения белка, основанный на противоточной ферментативной обработке протеазой и последующим кислотным осаждением. Barker, Green и Xu [64] предложили схему непрерывной экстракции белка с последующим концентрированием экстракта. Полученный концентрированный раствор смешивают с холодной водой для образования мицелл, которые осаждают в отстойнике в виде белковой массы.

В 2008 году Лобанов В.Г. и др. [65] запатентовали способ получения изолята белка подсолнечного шрота. Исходное сырье обрабатывают раствором NaCl, после чего нерастворимый твердый остаток отделяют фильтрованием, а полученный экстракт обрабатывают 3-5% раствором янтарной кислоты для осаждения белка. Предлагаемый способ позволяет получить целевой продукт светлого цвета с высоким содержанием белка. Классическая блок-схема получения белковых препаратов подсолнечника представлена на **рисунке 5**.



**Рисунок 5.** Блок-схема производства белковых концентратов и изолятов.

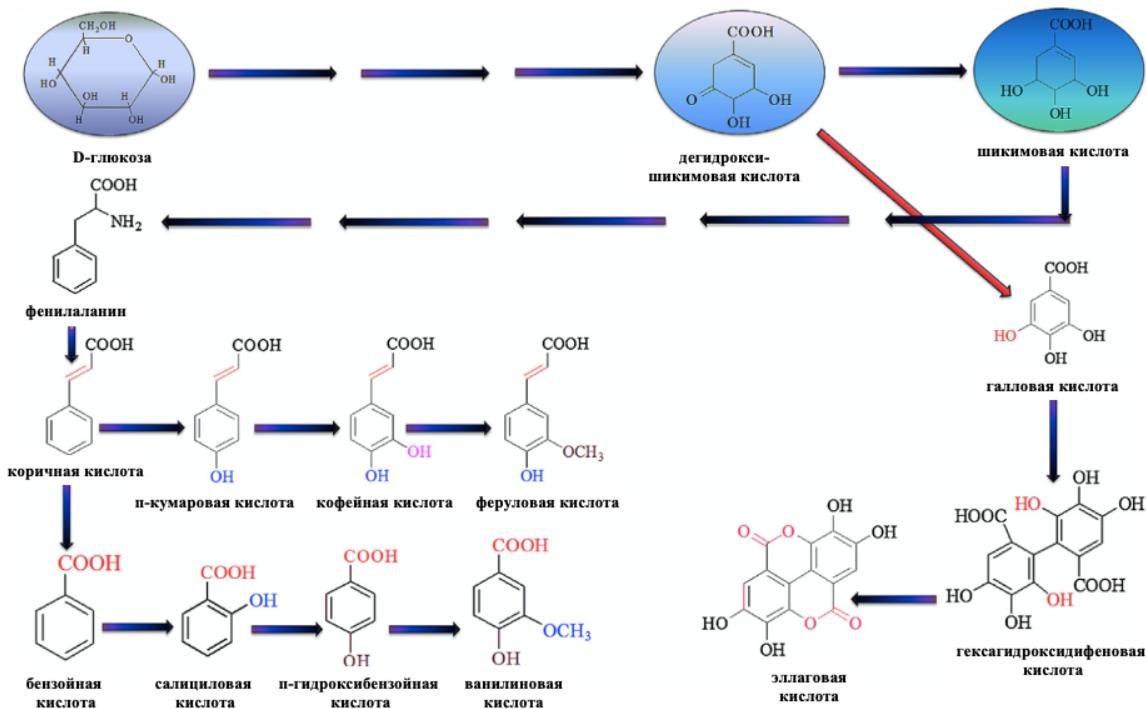
Основным технологическим недостатком существующих методов получения подсолнечных концентратов и изолятов является потребность в применении щелочей, кислот и солей высоких концентраций, так как их последующее удаление из конечного продукта требует многостадийной промывки. Использование большого количества воды, в свою очередь, делают технологии экономически неэффективными и экологически небезопасными, что ограничивает их практическое применение.

Кроме того, все вышеперечисленные технологии позволяют получать белок, пригодный в основном для использования в комбикормах, из чего следует, что разработка подходов к переработке вторичного сырья подсолнечника в белковые концентраты и изоляты, предназначенные для пищевой промышленности, является актуальной и перспективной задачей современной науки.

### Глава 3. Фенольные соединения подсолнечного шрота

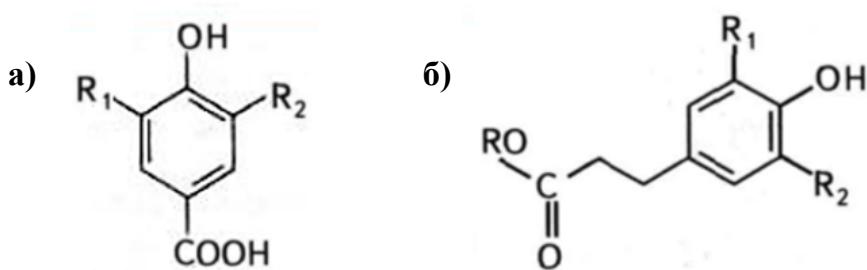
Термин «фенолы» охватывает около 8000 встречающихся в природе соединений, которые имеют одну общую структурную особенность – ароматическое кольцо, функционализированное несколькими гидроксильными группами. Согласно современной классификации, основанной на количестве субъединиц, фенолы делят на простые фенолы и полифенолы [66]. Полифенолы содержат несколько OH-групп, присоединенных к одному или нескольким ароматическим циклам, и встречаются в растениях как в свободном виде, так и в виде эфирных и гликозидных производных [67].

Растительные фенолы являются наиболее распространенными вторичными метаболитами, производимыми в основном шикиматным путем из L-фенилаланина и L-тирофина (рисунок 6) [68]. Именно вторичные метаболиты отвечают за запах, цвет и вкус продуктов. Хорошо известно, что фенольные соединения выполняют множество функций, включая рост, развитие и защиту растений, также они признаны сильными природными антиоксидантами, обладающими противовоспалительными, противораковыми, противомикробными, противоаллергическими, противовирусными, антитромботическими и гепатопротекторными свойствами [69].



**Рисунок 6.** Схема синтеза фенольных соединений по шикиматному пути.

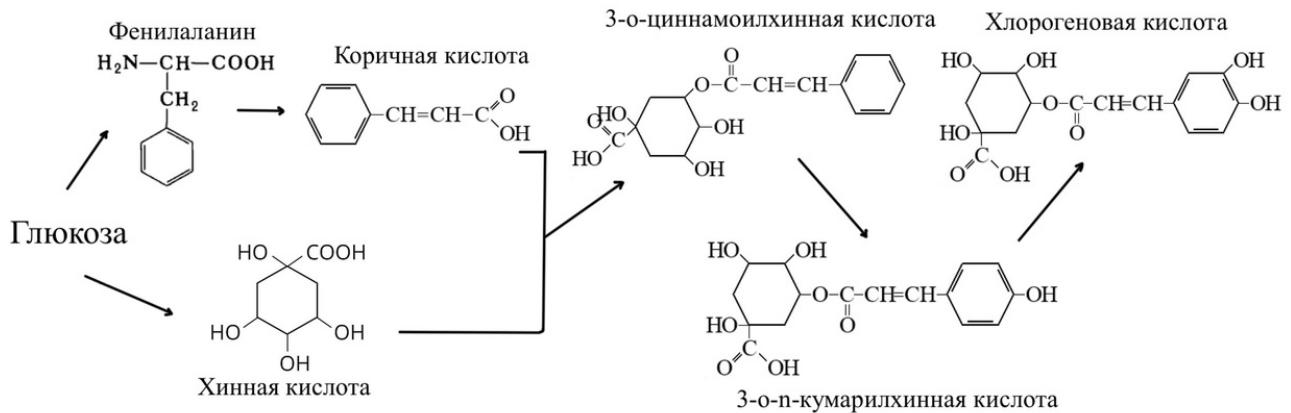
Термин «фенольные кислоты» относится к фенолам, содержащим одну карбоксильную группу. Их основными природными источниками являются семена, фруктовая кожура и листья овощей, где они накапливаются в наибольших концентрациях. Большинство фенольных кислот существуют в растениях в связанных формах (амиды, эфиры, гликозиды) и редко встречаются в свободном виде. Различают две основные группы: гидроксибензойные и гидроксикоричные кислоты (**рисунок 7**) [70].



**Рисунок 7.** Структурные формулы а) гидроксибензойных и б) гидроксикоричных кислот.

Гидроксибензойные кислоты, имеющие общую структуру  $C_6-C_1$  и являющиеся производными бензойной кислоты, обнаруживаются в растениях в конъюгированной с сахарами или органическими кислотами форме или в виде лигнина в составе клеточной стенки. Они содержатся в незначительных количествах в таких продуктах, как красные фрукты, лук, черная редька и т.д. К наиболее распространенным соединениям этой группы относятся п-гидроксибензойная, протокатеховая, ванилиновая и сирингиновая кислоты [71].

Гидроксикоричные кислоты, являющиеся производными коричной кислоты, часто встречаются в пищевых продуктах в виде простых эфиров с хинной кислотой или глюкозой. Например, кофейная и хинная кислоты образуют хлорогеновую кислоту (кофеил-3-хинную), присутствующую во многих фруктах, кофе и семенах подсолнечника. Схема ее синтеза представлена на **рисунке 8** [72]. К наиболее распространенным представителям этого класса также относят феруловую, кофейную, п-кумаровую и синаповую кислоты [73].



**Рисунок 8.** Схема синтеза хлорогеновой кислоты из глюкозы.

Фенольные соединения составляют около 4 масс.% подсолнечного шрота, причем доминирующим компонентом (свыше 70%) является хлорогеновая кислота [74]. Еще в 1897 году Osborne и Campbell [75] описали наличие органического соединения в семенах подсолнечника, которое они назвали «*helianthotannic acid*», и объяснили темный цвет своего белкового продукта присутствием в нем этого соединения. Позже Gorter [76] идентифицировал это соединение как хлорогеновую кислоту, а Rudkin и Nelson [77] определили структуру соединения как эфир кофейной и хинной кислот.

Хлорогеновая кислота в подсолнечном шроте находится преимущественно в свободной форме (около 61%). При этом именно наличие связанной с молекулами белка хлорогеновой кислоты в готовых белковых препаратах ограничивает использование подсолнечного протеина в пищевой промышленности.

### 3.1 Фенол-белковые взаимодействия

Исследование взаимодействия между фенольными соединениями и белками является актуальной научной задачей. Экспериментально установлено, что такое взаимодействие положительно влияет на стабилизацию белковых коллоидных систем. В частности, Sarker и др. [78] и Rossetti и др. [79] зафиксировали улучшение пенообразования и устойчивости систем «белок-ПАВ» вследствие сшивания белковых молекул фенолами в адсорбированном слое.

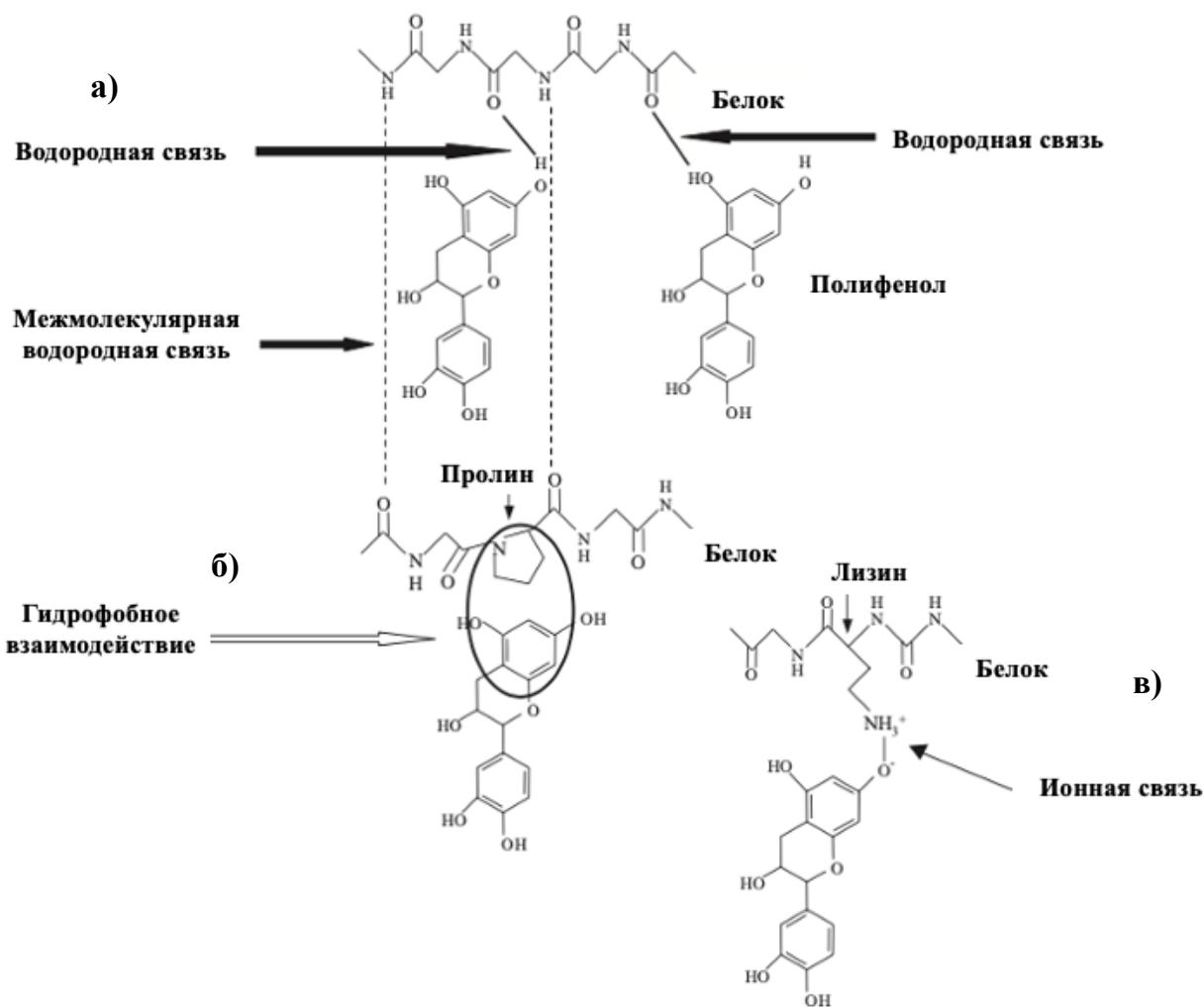
Однако помимо полезных эффектов, фенол-белковые взаимодействия могут иметь и негативные последствия. Во-первых, в результате таких реакций образуются нерастворимые агрегаты, которые выпадают в осадок и при употреблении в пище вызывают неприятное ощущение шероховатости и стянутости неба. Во-вторых,

взаимодействие между фенольными соединениями и белками может привести к появлению зеленого окрашивания у конечных продуктов. В-третьих, полифенолы негативно влияют на переваримость белка из-за разрушения незаменимых аминокислот и ингибирования протеолитических и гликолитических ферментов [80]. В результате, фенол-белковые взаимодействия приводят к значительным сложностям валоризации белков из растительных источников и побочных продуктов агропромышленного комплекса [81] и, в частности, ограничивают использование подсолнечного шрота в пищевой промышленности [82].

Фенольные соединения могут соединяться с белками двумя различными способами: нековалентно (водородные связи, ионные и гидрофобные взаимодействия) и ковалентно (окисление до хинонов). При этом окисление фенольных соединений до хинонов может происходить либо химически в щелочных условиях, либо ферментативно в присутствии полифенолоксидазы (РРО) [74].

### ***Нековалентные взаимодействия***

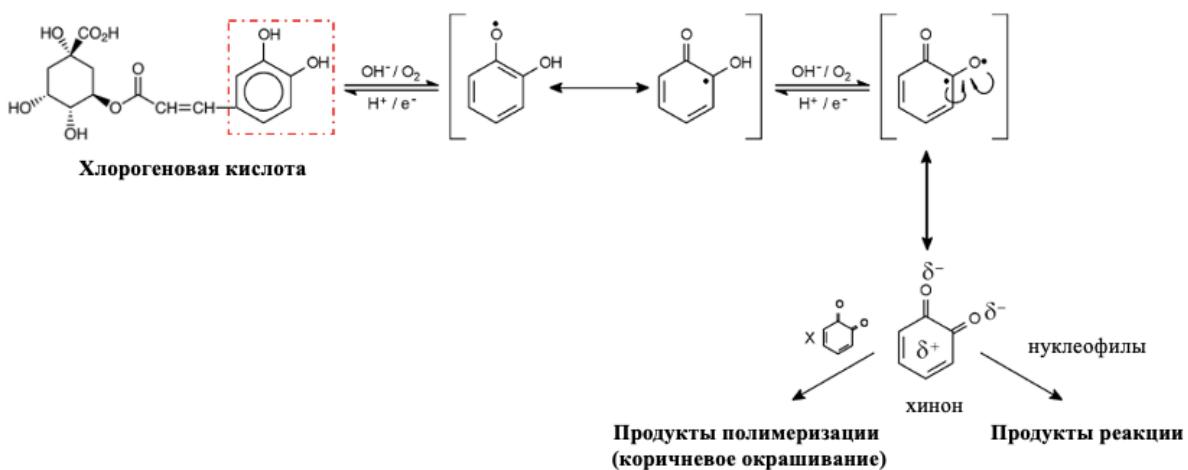
Нековалентные взаимодействия между молекулами белков и фенольных соединений, приводящие к образованию фенол-белковых конъюгатов, обычно являются обратимыми и осуществляются в основном за счет гидрофобных водородных связей. В частности, атом водорода гидроксильной группы фенола способен образовывать водородную связь с карбонильными группами белка (**рисунок 9а**). Помимо этого, водородная связь может возникать между водородом OH-группы фенола и азотом NH-группы или кислородом OH-группы белка, соответственно. Гидрофобные аминокислотные остатки белковой молекулы преимущественно взаимодействуют с неполярным ароматическим кольцом фенола (**рисунок 9б**). Ионные связи в реакциях фенол-белковых взаимодействий играют незначительную роль. Одним из немногих примеров является взаимодействие положительно заряженной  $\varepsilon$ -аминогруппы лизина с отрицательно заряженной OH-группой фенола (**рисунок 9в**) [80].



**Рисунок 9.** Нековалентные фенол-белковые взаимодействия с помощью а) водородных связей, б) гидрофобных связей, в) ионных связей.

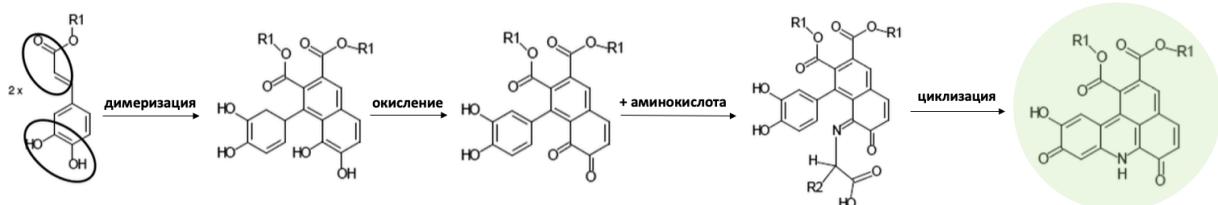
### *Ковалентные взаимодействия*

Фенольные соединения подвержены как ферментативному, так и неферментативному окислению в присутствии кислорода. Наличие катехолового фрагмента (двух орто-гидроксильных групп в ароматическом кольце) в структуре хлорогеновой кислоты обеспечивает ее способность к ферментативному окислению до о-хинона (**рисунок 10**). Этот процесс приводит к образованию электрофильных производных, способных вступать в реакции нуклеофильного присоединения с молекулами белка [83].



**Рисунок 10.** Схема реакций окисления хлорогеновой кислоты до хинона.

Позеленение наблюдается при взаимодействии аминокислот подсолнечника с хлорогеновой кислотой, но не при реакции аминокислот с этил п-кумаратом, этил ферулатом или этил 3,4-дигидроксибензоатом. Это указывает на необходимость наличия как о-дифенольной, так и циннаматной молекулы для образования пигмента [84]. Хиноны хлорогеновой кислоты являются электротрофилами и могут ковалентно связываться с нуклеофильными тиоловыми или аминогруппами белков. В отсутствие аминокислот свободные радикалы реагируют друг с другом, образуя коричневые полимерные пигменты [85]. На **рисунке 11** иллюстрируется процесс димеризации двух молекул хлорогеновой кислоты с последующим их окислением до хинона, после чего происходит реакция присоединения аминокислоты, завершающаяся нуклеофильной циклизацией с образованием зеленого пигмента – тригидроксибензакридина (ТВА) [74].

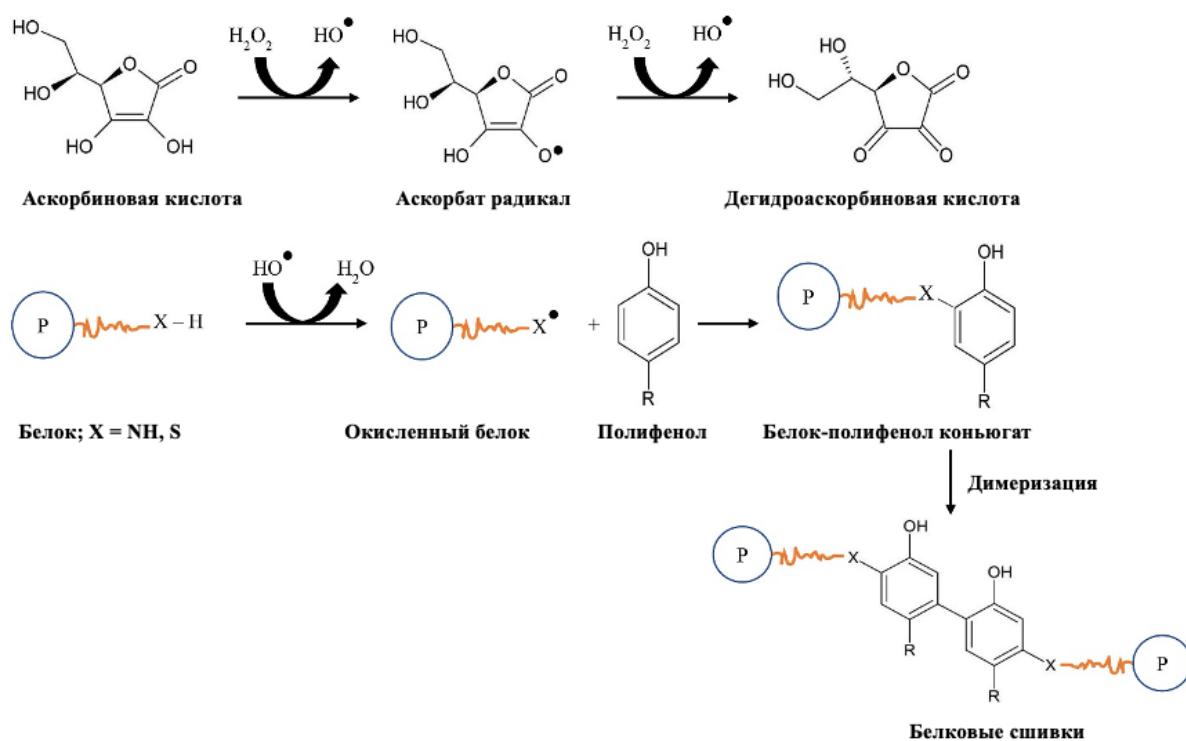


**Рисунок 11.** Схема окисления хлорогеновой кислоты, приводящая к образованию зеленого пигмента.

Namiki и др. [86] и Yabuta и др. [87] идентифицировали тригидроксибензакридин, окрашенный в зеленый цвет и обнаруживаемый при 685 нм. Появление зеленого пигмента наблюдали только при взаимодействии с

глицином, аланином, гистидином, фенилаланином, глутамином и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина. В то же время аммиак, вторичные и третичные амины образовывали соединения с коричневой окраской.

К неферментативным способам образования ковалентной связи также относится радикальная сшивка (**рисунок 12**). В ходе данного процесса аскорбиновая кислота и пероксид водорода выступают в качестве окислительно-восстановительной пары, инициирующей реакцию [88]. Гидроксильные радикалы окисляют аминокислоты боковой цепи белка, после чего локализованные на белковых молекулах радикалы взаимодействуют с полифенолами, образуя ковалентную связь [89, 90].



**Рисунок 12.** Схема механизма радикальной сшивки белков с полифенолами.

Как орто-дифенол, хлорогеновая кислота является хорошим субстратом для ферментативного окисления полифенолоксидазой (ПРО). Оптимальный pH для ПРО подсолнечника составляет около 7.9, при этом очень высокие и низкие значения pH препятствуют протеканию ферментативной реакции из-за неправильных конформаций активного участка [74]. В сложных пищевых системах меньше заряженных остатков аминокислот, способных вступать в реакции нуклеофильного присоединения при кислом значении pH, поэтому нестабильные хиноны быстро

вступают в реакцию полимеризации друг с другом. Эти полимеры меланина ответственны за «поддумянивание», наблюдаемое у разрезанных фруктов и овощей, и представляют собой проблему качества для пищевой промышленности [91].

После ферментативного окисления может происходить неферментативное, особенно в щелочной среде. Если белковые препараты (подсолнечные концентраты и изоляты), содержащие хлорогеновую кислоту, используются в продуктах с нейтральным или кислым pH без дополнительной термической обработки, они должны сохранять нейтральный цвет. Однако в условиях щелочного pH происходит медленное образование зеленого окрашивания, ускоряющегося при нагревании [74].

Saeed и Cheryan [83] впервые обнаружили, что взаимодействие белков с хлорогеновой кислотой зависит от pH среды. При pH 9 связывание осуществляется преимущественно через водородные и ковалентные связи, при pH 7 основную роль играют ионные связи, а при pH 5 – гидрофобные. В целом окисление хлорогеновой кислоты усиливается с ростом pH, температуры и времени, в присутствии кислорода и с увеличением концентрации кислоты [92].

### **3.2 Способы очистки белков подсолнечника от фенольных соединений**

Несмотря на растущий интерес потребителей к продуктам питания с высоким содержанием фенольных соединений из-за их привлекательных антиоксидантных свойств, именно их наличие в подсолнечных концентратах и изолятах является сдерживающим фактором для расширения области их применения в пищевой промышленности. В связи с этим активно разрабатываются новые способы очистки белковых препаратов от фенольных соединений еще на этапе извлечения белка из подсолнечного шрота.

Значительное количество исследований направлено на разработку технологических подходов, которые бы предотвращали взаимодействие фенольных соединений с белком подсолнечника на стадии его экстракции из вторичного сырья. Общие стратегии включают экстракцию фенольных соединений с помощью предварительной обработки смесям органических растворителей с водой до щелочной экстракции белка, а также посредством введения антиоксидантов на стадии экстракции [54].

Наиболее распространенным технологическим способом является извлечение фенольных соединений с помощью органических растворителей, таких как 40%

растворы метанола, этанола и ацетона [93]. Malik и Saini [55] так же удаляли фенольные соединения диспергированием обезжиренного шрота в метаноле, однако использовали меньшую концентрацию – 60%, а экстракцию повторяли четыре раза.

В работе Sodini и Canella [94] описывается способность 1-бутанола, подкисленного 0.005 н HCl, в ходе многократной экстракции удалять хлорогеновую и кофейную кислоты из подсолнечного шрота без заметной денатурации белка.

В недавнем исследовании Jia и др. [95] пришли к выводу, что достичь удаления 95% фенольных соединений подсолнечного шрота при незначительных потерях белка (около 1%) возможно при использовании девяти стадийной экстракции 80% этанолом при температуре 25°C.

Подходы Ivanova и др. [48] и Pickardt и др. [54] заключались в применении экстракции с высокой ионной силой. в своих работах продемонстрировали, что pH около 6 и 1.6-2.1 моль/л раствора NaCl обеспечивает высокую эффективность экстракции – 50% (против 20% без NaCl). Добавление соли повысило количество извлекаемого белка при pH около нейтрального значения и позволило получить светлоокрашенные белковые продукты. Изоляты белка подсолнечника, полученные с помощью предложенного процесса, обладают перспективными функциональными свойствами для использования в различных пищевых продуктах.

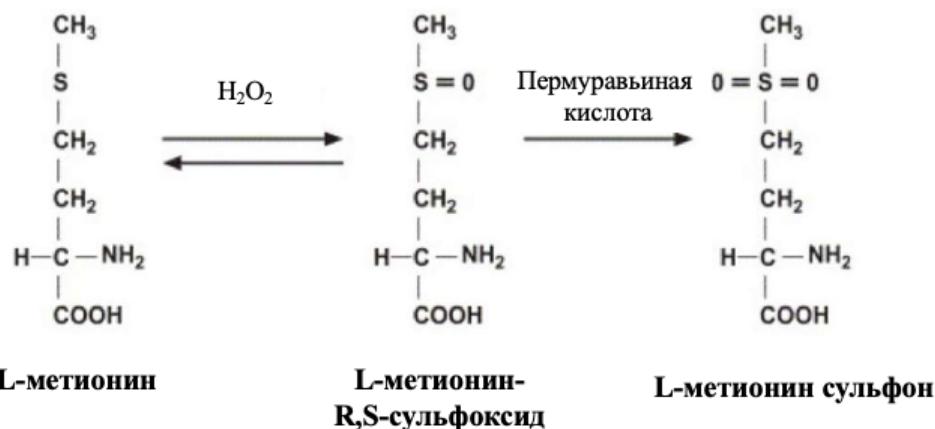
Ультразвуковая (УЗ) экстракция является эффективным и перспективным способом выделения полифенолов и других биологически активных соединений из растительных матриц. Под воздействием ультразвука образуются кавитационные пузырьки, разрушающие клеточные стенки растений и способствующие высвобождению целевых соединений в растворитель. В отличие от традиционных методов экстракции, данный процесс менее трудоемок и более экономичен [96].

Микроволновая экстракция позволяет эффективно удалять фенольные соединения из растительного сырья в течение короткого времени (30 минут) [97]. Так, при экстракции кофейной кислоты из листьев зеленого чая водно-этанольной смесью (1:1) при 85°C под СВЧ-излучением в течение 4 минут обеспечивает степень извлечения, сопоставимую с результатом классической 45-минутной экстракции [98].

Перспективным способом «защиты» белка от связывания с фенольными соединениями является добавление в экстракционную систему антиоксиданта

(сульфиты). В ряде исследований эти вещества используют в качестве защиты окраски растений, а также консерванта фенольных соединений [99-102]. Однако механизм ингибиции сульфитами ферментативного окисления до сих пор не установлен, а на настоящий момент в литературе все еще отсутствуют данные о применении данного метода в процессе выделения белка из подсолнечного шрота.

Также для удаления и разрушения хлорогеновой и кофейной кислот известно применение перекиси водорода [103]. Однако при обработке белков этим реагентом неизбежно окисление серосодержащих аминокислот, в частности метионина, в сульфоксидную или сульфоновую формы (рисунок 13), не представляющие пищевой ценности.



**Рисунок 13.** Окисление метионина до сульфоксидной (L-метионин-R,S-сульфоксид) и сульфоновой (L-метионин сульфон) форм.

Еще один способ осаждения белка и связывания фенольных соединений основан на добавлении к экстракту 3-5% раствора янтарной кислоты [59, 104]. При этом хлорогеновая и янтарная кислоты образуют полярные водорастворимые комплексы, которые эффективно удаляются при промывании осадка водой [65]. Однако, как показано в работе [105], хотя янтарная кислота ингибирует окисление фенольных кислот, данный способ не устраниет горьковатый вкус конечного белкового препарата.

Широко распространенным подходом для разделения биологически активных соединений является твердофазная экстракция (ТФЭ) в связи со своей высокой экстракционной способностью и экологичностью по сравнению с другими методами [106]. Для повышения селективности разделения соединений в объектах со сложной матрицей используют магнитные наноматериалы, в частности,

наночастицы магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Их использование в пробоподготовке основано на сочетании высокой удельной поверхности и способности к сепарации внешним магнитным полем. Модификация поверхности наночастиц магнетита специфическими лигандами (оксидом кремния, поверхностно-активными веществами, полиэлектролитами, биополимерами и органическими кислотами) обеспечивает стабилизацию и селективных захват аналита [107, 108].

Однако до сих пор ни один из описанных подходов к очистке белков подсолнечного шрота от фенольных соединений до сих пор не масштабирован. Обработка органическими растворителями оказалась эффективной с точки зрения сохранения кремового цвета конечного белкового продукта, но при этом происходит значительная потеря низкомолекулярных белковых фракций. Использование многократной экстракции, особенно, в сочетании с использованием солевых растворов высокой концентрации нецелесообразно с точки зрения увеличения солевых стоков и дороговизны их утилизации. Кроме того, нежелательно использование токсичных органических растворителей в пищевой промышленности.

## **Глава 4. Методы контроля качества сырья и конечных белковых продуктов**

Исходное растительное сырье должно быть чистым, свободным от посторонних примесей, а основными показателями качества являются: массовая доля сырого протеина (белка), клетчатки, золы, жиров и влажность [109]. Кроме того, обязательным требованием как к исходному сырью, так и производимым из него концентратам и изолятам, если они используются в пищевой промышленности, является контроль содержания фенольных соединений.

### **4.1 Методы определения белка**

В связи с ростом интереса производителей к включению белков, получаемых из вторичных продуктов агропромышленного комплекса, в рацион питания человека, возникает спрос на быстрые и доступные методы определения этих веществ. При этом анализ пищевого белка не всегда является простой процедурой. Сложность белкового состава и взаимодействие между различными биологически активными соединениями матрицы могут снизить доступность белков, что приводит к недооценке их содержания [110].

#### **4.1.1 Азотометрические методы**

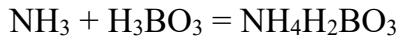
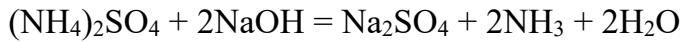
##### ***Метод Кельдаля***

В 1883 году Иоганн Кельдаль разработал способ определения органического азота [111], который в настоящее время является эталонным методом для контроля содержания белка в пищевой промышленности и включает в себя три стадии:

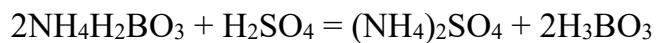
1) Образец подвергают минерализации в присутствии серной кислоты и катализатора, в результате чего все формы азота переходят в сульфат аммония:



2) Полученный сульфат аммония обрабатывают концентрированным раствором щелочи, а высвободившийся аммиак отгоняют в приемную колбу, содержащую известное количество борной кислоты:



3) Определяют количество перегнанного аммиака, связанного в лабильный комплекс с помощью борной кислоты, титрованием стандартным раствором серной кислоты:



Полученное значение азота умножают на коэффициент пересчета для определения содержания белка. Для большинства источников белка используется общий коэффициент пересчета 6.25 [112].

### *Метод Дюма*

Еще одним методом определения общего азота является автоматизированный метод Дюма. Принцип метода заключается в сжигании образца при температуре около 900°C в среде избыточного кислорода, в результате чего образуется вода, углекислый газ, азот и смесь оксидов азота. Затем оксиды азота катализически восстанавливают до элементарного азота и отделяют от примесей воды и углекислого газа. Содержание азота в образце определяют с помощью детектора теплопроводности [113].

Метод Дюма, по сравнению с методом Кельдаля, имеет ряд преимуществ: он прост в исполнении и автоматизирован; гораздо быстрее (измерение занимает несколько минут, по сравнению с несколькими часами для метода Кельдаля) и имеет более низкий предел обнаружения (0.001 мг против 0.1 мг по Кельдалю). Кроме того, данный метод не требует использования опасных или токсичных химических реагентов и дорогостоящих катализаторов [114].

Однако оба азотометрических метода обладают общим недостатком: они неселективны по отношению к природе азота исследуемого образца и определяет общий азот независимо от того, является ли он органическим и входит в состав молекул белка или привнесен в продукт с посторонним азотсодержащим веществом. Ряд таких веществ как меламин, сульфат аммония и мочевина, дают те же результаты, что и белки по методам Кельдаля и Дюма, и могут быть использованы в качестве фальсификаторов [115].

### **4.1.2 Биохимические методы**

Альтернативой определению общего азота являются спектрофотометрические методы, основанные как на поглощении структурами

ароматических колец определенных аминокислот, так и на взаимодействии красителей или ионов меди с заряженными аминокислотными остатками или пептидными связями [116].

### ***Прямой спектрофотометрический метод***

Белки за счет остатков ароматических кислот (в основном тирозина и триптофана) демонстрируют сильное поглощение в ультрафиолетовой области при длине волны 280 нм. Однако поскольку содержание тирозина и триптофана в белках из различных источников неодинаково, их поглощение в УФ-области может сильно меняться [117].

Метод использовался для определения содержания белка в молоке [118] и мясных продуктах [119], однако широкого применения в пищевых системах он не нашел. Вероятная причина заключается в том, что при анализе реальных объектов возможно перекрывание пика аминокислоты мешающим соединением матрицы с максимум поглощения в этой же области спектра.

### ***Метод Варбурга и Христиана***

Использование прямого спектрофотометрического метод затрудняется еще и наличием во многих белковых материалах нуклеиновых кислот, которые имеют ярко выраженную полосу поглощения при 280 нм. Однако еще более интенсивное поглощение нуклеиновые кислоты демонстрируют при 260 нм (в отличие от белков). Варбург и Христиан использовали этой свойство для разработки расчетного метода, позволяющего исключить влияние нуклеиновых кислот при определении белка [120]. Согласно данному методу, содержание белка в образце определяют по формуле:

$$C = 1.55 \times A^{280} - 0.76 \times A^{260},$$

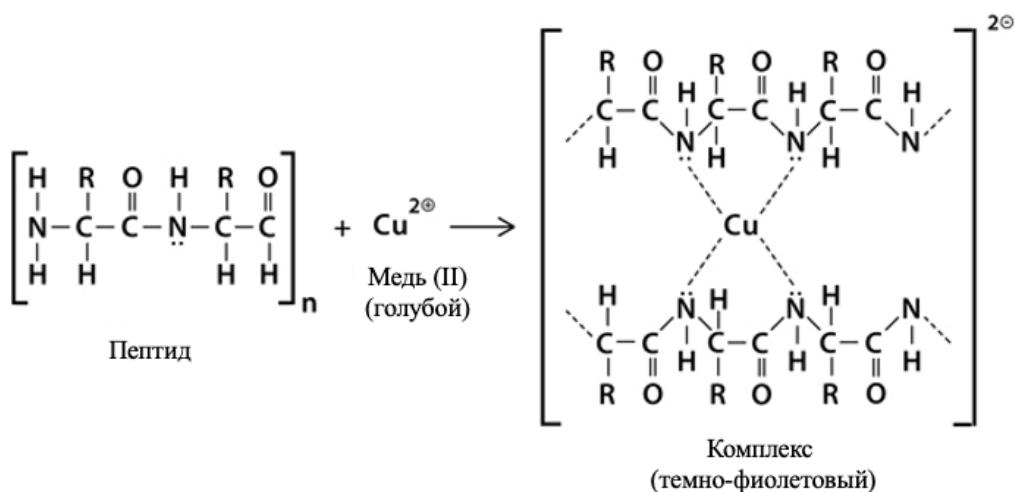
где 1.55 и 0.76 – эмпирические коэффициенты;

$A^{280}$  и  $A^{260}$  – поглощение при 280 нм и 260 нм, соответственно.

Аналогично прямому спектрофотометрическому методу, метод Варбурга и Христиана оказывается неприменимым при анализе сложных матриц, содержащих соединения с близким максимумом поглощения.

## **Биуретовый метод**

При взаимодействии ионов меди с пептидными связями в щелочных условиях образуется комплекс фиолетового цвета (**рисунок 14**) с максимумом поглощения при 540 нм [121].



**Рисунок 14.** Реакция образования комплекса при взаимодействии ионов меди (II) с пептидными связями молекулами белка.

Данный метод использовался для определения содержания белка в сое [122], зерне [123], мясе [124]. Однако не рекомендуется его использование для анализа образцов, содержащих соли аммония, поскольку они могут образовывать комплексы с медью. Метод также не подходит анализа мутных и склонных к седиментации растворов.

## **Метод Брэдфорда**

Метод основан на связывании красителя кумасси бриллиантовый синий G250 с аминокислотными остатками белка (в первую очередь с аргинином и лизином), при котором происходит сдвиг максимума поглощения с длины волны 470 нм (свободный краситель) до 595 нм (связанный краситель), при которой проводят определение [125].

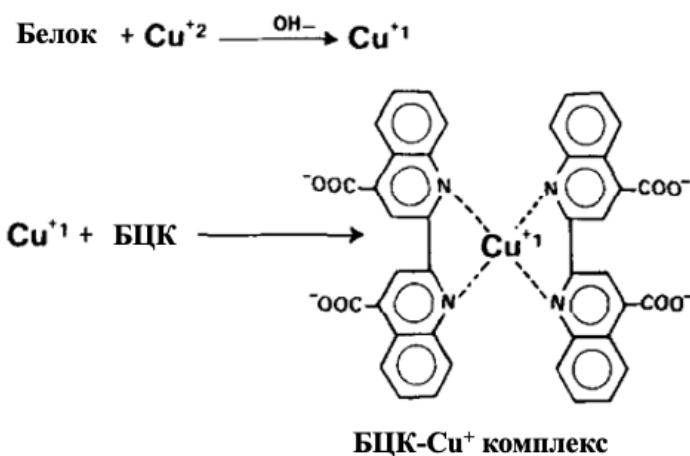
Как и другие методы связывания красителей, метод Брэдфорда опирается на амфотерную природу белков. Когда раствор, содержащий белок, подкисляется до меньшего значения pH, чем изоэлектрическая точка интересующего белка, добавленный краситель связывается электростатически. Эффективность связывания повышается за счет гидрофобного взаимодействия молекулы красителя с

полипептидной основой, к которой примыкают положительно заряженные аминокислотные остатки [126].

Метод Брэдфорда был успешно использован для определения содержания белка в клубнях картофеля [127] и в пивных продуктах [128]. При этом известно, что краситель кумасси преимущественно взаимодействует с остатками аргинина и лизина в белковых молекулах, что может вызвать систематическую погрешность при определении белков с разным аминокислотным составом. Кроме того, наиболее часто используемый в качестве белкового стандарта бычий сывороточный альбумин (БСА) обладает чрезмерным ответом на связывание с красителем и, таким образом, может недооценивать содержание белка в исследуемом образце.

### ***Метод с бицинхониновой кислотой (БЦК)***

В щелочной среде белки способны восстанавливать ионы меди (II) до ионов меди (I) по механизму, аналогичному биуретовой реакции. Образовавшиеся ионы меди (I) взаимодействуют с бицинхониновой кислотой (БЦК), образуя стабильный фиолетовый комплекс (**рисунок 15**) с максимумом поглощения при 562 нм [129].



**Рисунок 15.** Реакция восстановления иона  $\text{Cu}^{2+}$  до  $\text{Cu}^+$  и последующего образования пурпурного комплекса БЦК и ионом  $\text{Cu}^+$ .

### ***Метод Лоури***

В основе метода Лоури лежит сочетание биуретовой реакции на пептидные связи и восстановление реактива Фолина-Чокальтеу ароматическими аминокислотами (тирозином и триптофаном), в результате чего образуется устойчивый комплекс синего цвета с максимумом поглощения при 750 нм [130].

## **4.2 Методы определения клетчатки**

Из современной научной литературы известен метод определения клетчатки по Геннебергу и Штоману. Данный подход включает последовательные этапы: гидролиз образца серной кислотой, омыление, экстракция липидов и гравиметрическое определение клетчатки в нерастворимом остатке [131].

Альтернативный метод предполагает последовательную обработку образца смесью уксусной и азотной кислот, а затем спиртом и эфиром. В ходе этого процесса сложные сопутствующие соединения подвергаются гидролизу, окислению и растворению, тогда как сырая клетчатка остается в виде твердого осадка [132].

Относительно новым и перспективным способом определения клетчатки является спектроскопия ближней ИК области (БИК). Михальчук и Пастухова [133] разработали калибровочную модель высокой достоверности для определения сырой клетчатки в кукурузном силюсе с помощью БИК-анализа, Безлюдный и Берестов [134] применили данный метод для определения сырой клетчатки в зерне ярового ячменя, а в исследовании [135] БИК-спектроскопия была использована в качестве скрининга для оценки общего содержания клетчатки в различных сортах ячменя.

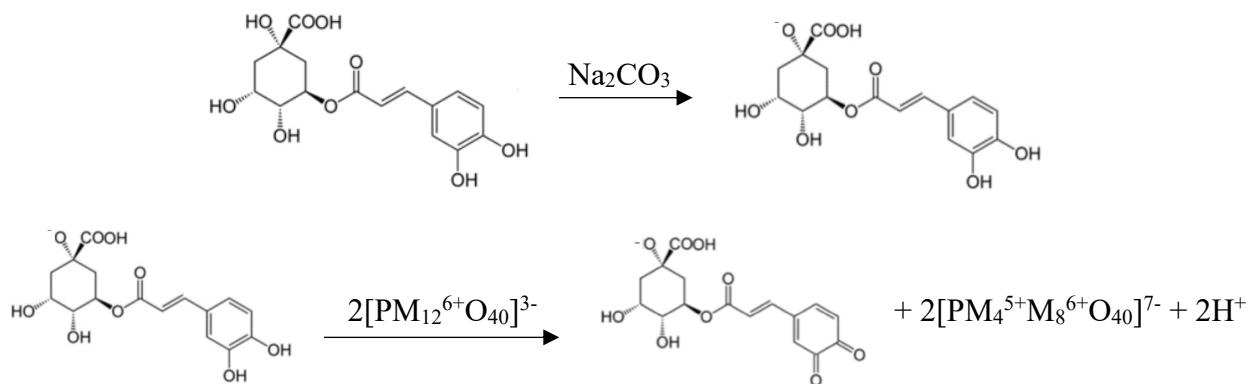
## **4.3 Методы определения фенольных соединений**

### **4.3.1 Спектрофотометрические методы**

К наиболее широко применяемым спектрофотометрическим методам анализа фенольных соединений относят метод Фолина-Чокальтеу и метод Берлинской лазури.

#### ***Метод Фолина-Чокальтеу***

Метод Фолина-Чокальтеу, используемый для определения общего содержания фенольных соединений в образцах растительного происхождения, был разработан Swain и Hills в 1959 году [136]. Он основан восстановления смеси фосфомолибденовой и вольфрамовой кислот гидроксильной группой фенола в щелочной среде с образованием устойчивого яркоокрашенного комплекса (вольфрамовая синь) с максимумом поглощения в диапазоне 680-785 нм (**рисунок 16**) [137].



**Рисунок 16.** Реакция хлорогеновой кислоты с реагентом Фолина-Чокальтеу.

С помощью данного метода Chunhua Dai и др. [138] определяли общее содержание фенольных соединений в образцах соевого шрота. Образец смешивали с одноименным реагентом, после чего нейтрализовали реакцию карбонатом натрия. Через 1 час измеряли поглощение исследуемых растворов при 760 нм, а общее содержание фенольных соединений рассчитывали с помощью градуировочной зависимости, выражая результат в эквиваленте галловой кислоты.

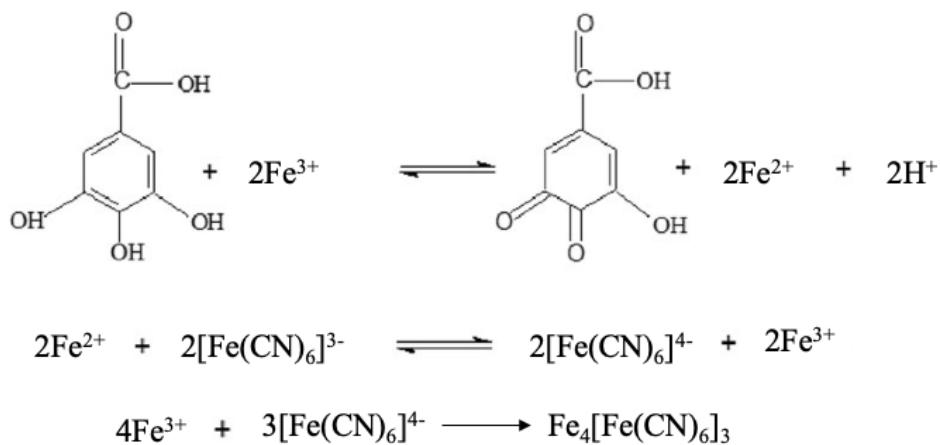
Grubasic R. и др. [139, 140] применили метод Фолина-Чокальтеу для определения фенольных соединений в стеблях, листьях и цветках растений вида *Plantago L.* Диапазон определяемых содержаний составил 5-50 мкг/мл. Результаты исследования продемонстрировали вариабельность общего содержания фенолов в зависимости от морфологической части растения. Так, максимальную концентрацию фенольных соединений обнаружили в листьях – 10.15%, а в стеблях и цветках – 4.34% и 5.56%, соответственно.

В работе [141] метод Фолина-Чокальтеу использовали для определения общего содержания фенольных соединений в образцах меда. Авторы исследовали влияние pH на результаты анализа и установили, что при pH 7.9 удается точно измерить содержание фенольных соединений, исключая влияние редуцирующих сахаров. Предел обнаружения модифицированной методики составил 2.55 мкг/мл.

Несмотря на широкое распространение данный метод не очень специфичен и обнаруживает другие типы соединений, которые могут присутствовать в большом количестве в экстрактах растений, например, сахара и аминокислоты [142].

## *Метод Берлинской лазури*

Еще один быстрый, простой и дешевый метод для определения содержания фенольных соединений – метод Берлинской лазури. Он основан на восстановлении  $\text{Fe}^{3+}$  до  $\text{Fe}^{2+}$  и последующем обнаружении  $\text{Fe}^{2+}$  путем образования хелата гексацианоферрата (II), известного как «берлинская лазурь» (рисунок 17), имеющего максимум поглощения при 720 нм [143].



**Рисунок 17.** Реакция образования берлинской лазури.

Известно о применении метода Берлинской лазури для оценки общего содержания фенольных соединений в таких продуктах, как сливы [144], травы [145], грибы [146]. Rueyo и Calvo [145] модифицировали исходную методику, сократив объем используемых растворителей с 3-4 мл до 300 мкл. Это изменение позволило одновременно регистрировать спектры поглощения для целого набора образцов, используя 96-луночный микропланшет. Усовершенствованный метод демонстрирует более низкие пределы обнаружения – менее 1 мкг/мл.

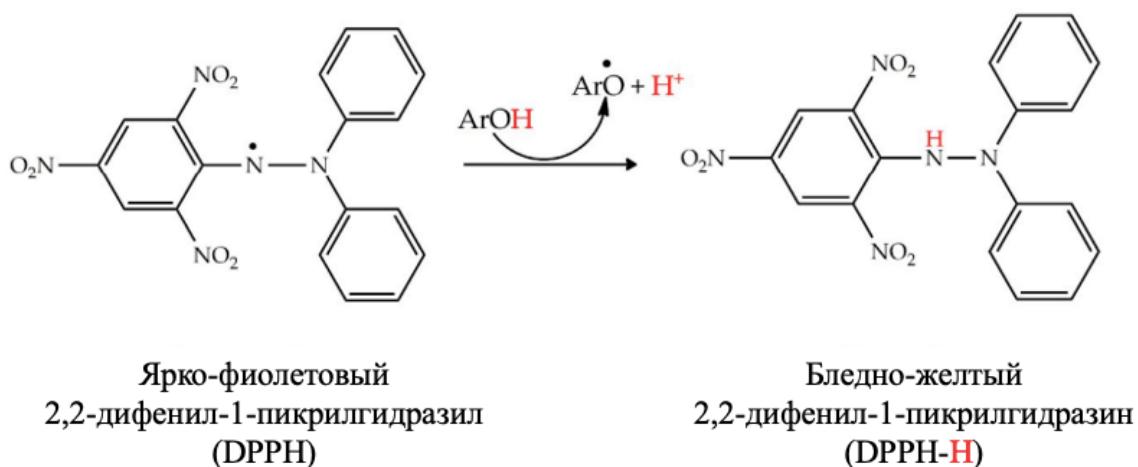
Сравнительный анализ методов ФЧ и БЛ при их использовании для определения общего содержания фенолов в образцах виноградных соков и чая различного происхождения выявил преимущества метода Берлинской лазури. Его процедура анализа более простая, требует меньше временных затрат на проведение реакции и является более селективной [147].

## *Методы определения общей антиоксидантной активности*

Так как полифенолы являются антиокисдантами, сильными восстановителями, часто их содержание определяют с помощью измерения

антиоксидантной активности (АОА) при взаимодействии этих веществ с окислителями.

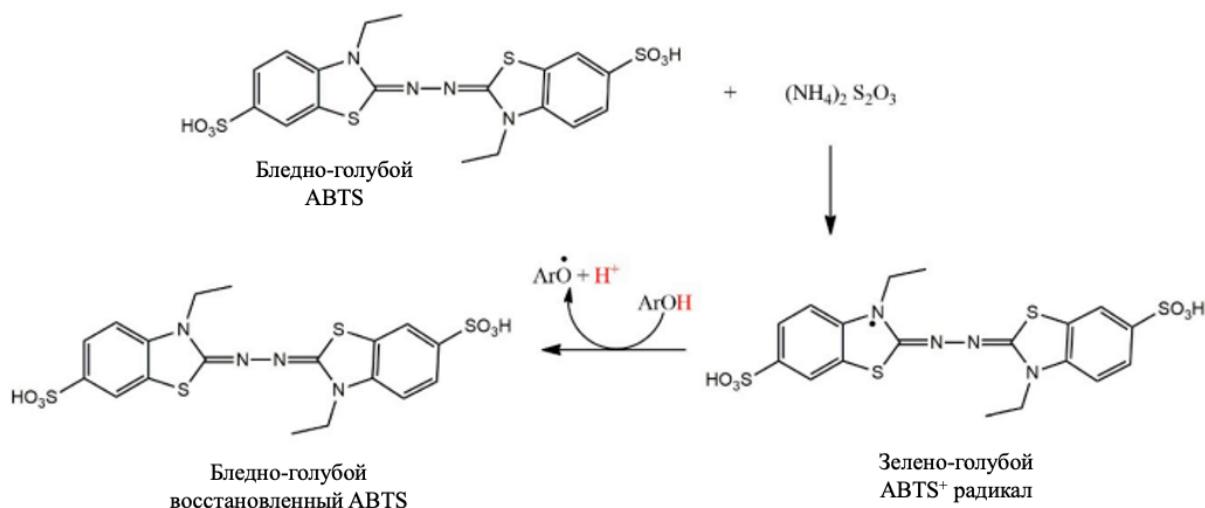
Метод DPPH связан с активностью антиоксидантов против 1,1-дифенил-2-пикрилгидразильного радикала (DPPH). Раствор DPPH имеет фиолетовый цвет, а принимая атом водорода или электрон от антиоксиданта он переходит в восстановленную форму (DPPH-H) бледно-желтого цвета (**рисунок 18**). Таким образом, когда DPPH восстанавливается до DPPH-H под действием антиоксиданта, поглощение раствора уменьшается [148].



**Рисунок 18.** Механизм реакции восстановления 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила.

Данный метод использовали для определения общего содержания фенолов в образцах фруктов [149], плодов финиковой пальмы [150], салата-латука [151] и экстрактов лекарственных растений [152]. При этом, метод оказался не подходящим для образцов, богатых антоцианами, таких как ягоды вишни и сливы, поскольку эти соединения поглощают в аналогичном спектральном диапазоне и мешают определению [153].

Метод ABTS основан на поглощающей активности антиоксидантов против катион-радикала ABTS<sup>+</sup>. ABTS<sup>+</sup> получают непосредственно перед проведением анализа путем окисления 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислоты) (ABTS) персульфатом аммония ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>). Когда радикал ABTS<sup>+</sup> (нестабильная форма) принимает электрон от антиоксиданта, сине-зеленый цвет переходит в бледно-голубой, что свидетельствует о регенерации ABTS (стабильной формы) (**рисунок 19**) [154].



**Рисунок 19.** Механизм реакции восстановления 2,2'-азино-бис(3- этилбензотиазолин-6-сульфокислоты).

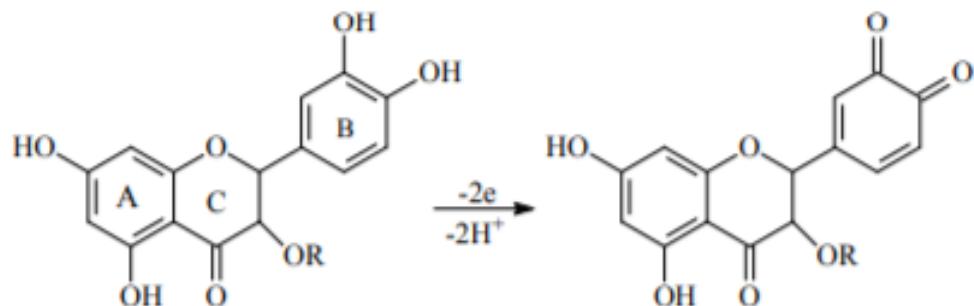
Известно о применении метода ABTS для определения общего содержания полифенолов в семенах лichi, виноградных косточках и кожуре банана [155] и других фруктах [156]. Однако данный метод имеет значительный недостаток – реакция образования радикала ABTS<sup>+</sup> занимает около 12-16 часов [157].

Спектрофотометрические методы просты, удобны и не требуют больших материальных затрат. Однако, как правило, помимо полифенолов в растительном сырье содержатся и другие соединения, обладающие восстановительными свойствами – аскорбиновая кислоты, тиолы, сахара, диоксид серы, а также некоторые витамины и аминокислоты. Эти компоненты способствуют увеличению интенсивности окрашивания реакционной среды, что является существенным недостатком данной группы методов. [147, 158, 159].

#### 4.3.2 Электрохимические методы

Электрохимические методы, а именно вольтамперометрические методы, особенно хорошо подходят для анализа фенольных соединений. Восстановительные свойства этих соединений связаны с их способностью отдавать электроны (**рисунок 20**). Таким образом, большинство из них обладают собственной электроактивностью, и их электрохимическое окисление при умеренных потенциалах используется для их обнаружения. С помощью вольтамперометрии возможно селективно определять полифенолы с хорошей чувствительностью даже ярко окрашенных и мутных образцах. Эти преимущества приводят к рассмотрению

электрохимических методов в качестве привлекательной альтернативы спектрофотометрическим методам для определения фенольных соединений в сложных матрицах [160].



**Рисунок 20.** Схема окисления полифенолов.

В доступной литературе не было обнаружено работ, посвященных тематике электрохимического определения фенольных соединений в шротах масленичных культур и белковых продуктах на их основе. Тем не менее, существует несколько исследований, посвященных применению данных методов для оценки содержания полифенолов в других растительных материалах [161, 162] и в вине [163].

A. Blasco и др. [164] рассмотрели возможность использования дифференциальной импульсной вольтамперометрии на стеклоуглеродном электроде для определения кофейной и хлорогеновой кислот, (+)-катехина, (-)-эпикатехина, рутина и кверцетина. Найдено значение селективного pH, при котором одновременно легко окисляются флавоноиды и отсутствует сигнал окисления фенольных кислот. Предложенный метод оказался пригоден для определения исследуемых фенольных соединений на основе профилей дифференциальной импульсной вольтамперометрии, полученных для образцов яблочного и грушевого сока.

W. Sousa и др. [165] в своей работе исследовали электрохимическое окисление кофейной, хлорогеновой, синаповой, феруловой и п-кумаровой кислот методом циклической вольтамперометрии на активированном стеклоуглеродном электроде. После апробации метода на реальном объекте – апельсиновом соке, авторы пришли к выводу, что данный метод является быстрым, простым и эффективным для определения перечисленных фенольных соединений. Кроме того, в ходе исследования выявлено селективное взаимодействие активированного

стеклоуглеродного электрода с кофейной и хлорогеновой кислотами, что делает этот метод пригодным для обнаружения и определения этих антиоксидантов в сложных растительных матрицах.

В работе Oliveira-Neto и др. [162] предложен подход к определению фенольных соединений в кофе с использованием амперометрического сенсора на основе углерода, модифицированного углеродными нанотрубками (MWNT). В основе метода лежит процесс электрохимического окисления гидроксикоричных кислот, присутствующих в кофе, в условиях дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Авторы работы отмечают, что данный простой, точный, быстрый и надежный метод может быть успешно использован в анализе других растительных и пищевых продуктов.

#### **4.3.3 Хроматографические методы**

Наибольшее количество исследований по обнаружению и определению фенольных соединений выполнено с применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который позволяет разделить сложную смесь, а затем проанализировать каждый компонент по отдельности.

Pedrosa и др. [166] изучили семена подсолнечника пяти различных генотипов и охарактеризовали их фенольный состав методом ВЭЖХ с фотодиодным матричным детектором. Ключевыми фенольными соединениями, обнаруженными и в ядре, и в шелухе, были хлорогеновая кислота, кофейная кислота и два производных кофеилхинной кислоты.

Результаты ВЭЖХ-анализа, описанного в работе De Leonardis и др. [167], показали наличие семи фенольных соединений в составе семян подсолнечника: хлорогеновой, кофейной, протокатеховой, о-коричной, феруловой и сиринговой кислоты (еще одно соединение не было идентифицировано). Исследование также показало, что хлорогеновая кислота является доминирующим фенольным соединением, составляя 79.4% от общего содержания фенолов.

В исследовании Zilic и др. [168] методом ВЭЖХ было идентифицировано шесть фенольных соединений, выделенных из семян и ядер подсолнечника. Аналогично предыдущей работе, хлорогеновая кислота была наиболее распространенным полифенолом, в то время как кофейная феруловая и розмариновая кислоты, мирицетин и рутин присутствовали в следовых количествах.

В последнее время метод ВЭЖХ в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) получил широкое применение для определения флаванолов и антоцианов во фруктах и продуктах на их основе. В частности, метод использовали для анализа мякоти различных сортов яблок [169], пюре манго [170], а также для оценки общего содержания фенолов в оливковом масле [171].

#### **4.3.4 Методы колебательной спектроскопии**

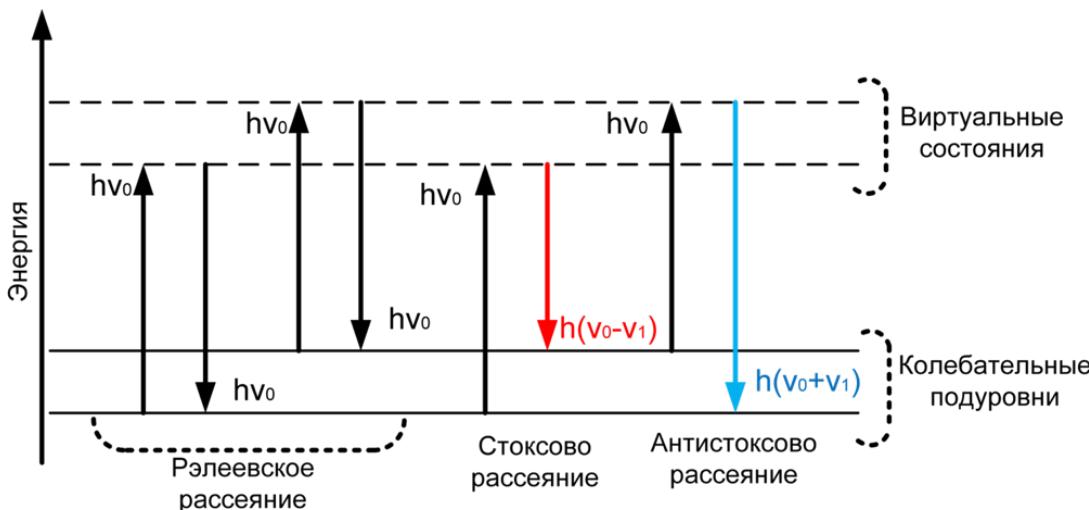
Методы инфракрасной (ИК) спектроскопии с преобразованием Фурье и спектроскопия комбинационного рассеяния, дополняя друг друга, позволяют проводить простой, быстрый и неразрушающий контроль сложных многокомпонентных матриц. Значительное преимущество методов колебательной спектроскопии по сравнению с другими аналитическими методами заключается в отсутствии пробоподготовки [172].

ИК-спектроскопия является наиболее часто применяемым методом колебательной спектроскопии, который позволяет определять фенольные соединения в пищевых продуктах на уровне 0.05-15 масс.% [173]. В недавнем исследовании [174] впервые предложен подход к определению хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом ИК-спектроскопии, что может обеспечить быстрый и недеструктивный скрининг данного растительного сырья на содержание основного фенольного компонента.

Этот метод также использовали для определения общего содержания фенольных соединений в яблоках [175] в режиме отражения, томатах [176], в чае [177], чернике [178], экстрактах, полученных из лекарственных растений [179], различных фруктов [180] и картофеля [181].

Комбинационное рассеяние света – явление неупругого рассеяния монохроматического излучения на молекулах вещества, характеризующееся изменением частоты света (рамановский сдвиг). При взаимодействии падающего фотона с молекулой происходит ее переход из основного состояния в возбужденное с последующей релаксацией. Если молекула поглощает и переизлучает фотон без изменения энергии, оставаясь на исходном колебательном уровне, процесс классифицируется как упругое (релеевское) рассеяние. При переходе молекулы на более высокий колебательный уровень возникает стоксово рассеяние, тогда как антистоксово рассеяние сопровождается переходом на уровень с меньшей энергией

(рисунок 21). При приближении энергии падающего излучения к разности энергий между основным и возбужденным электронными уровнями молекулы наблюдается резонансный рамановский эффект, сопровождающийся значительным увеличением интенсивности спектральных линий [182].



**Рисунок 21.** Диаграмма энергетических уровней.

Pinkie J. Eravuchira и др. [183] изучили КР-спектры семи изомеров хлорогеновой кислоты и сделали вывод, что только спектры 3,4-ди-О-кофеилхинной и 3,5-ди-О-кофеилхинной кислот имели схожие полосы комбинационного рассеяния, а все остальные изомеры хлорогеновой кислоты (3-О-кофеилхинная, 4-О-кофеилхинная, 5-О-кофеилхинная, 4,5-ди-О-кофеилхинная кислоты и 2-хлорэтиловый эфир 3-О-ферулхинной кислоты) показали различные характерные полосы средней и низкой интенсивности. Таким образом, спектроскопия комбинационного рассеяния может стать быстрым и простым инструментом для характеристики хлорогеновых кислот в растительном сырье, что позволит проводить эффективный и неразрушающий скрининг.

КР спектроскопия представляет собой высокоинформационный метод, обладающий значительным потенциалом для анализа растительных объектов. В то же время, ключевым ограничением метода остается его низкая чувствительность при определении многих фенольных соединений [184]. С момента своего открытия спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) существенно расширила практические возможности рамановской спектроскопии в различных областях анализа. Спектроскопия ГКР основана на усилении сигнала от молекул,

адсорбированных на шероховатых металлических поверхностях или наноструктурах. Усиление возникает благодаря возбуждению поверхностных плазмонов лазерным излучением, что приводит к увеличению локальных электрических полей. Поскольку интенсивность комбинационного рассеяния пропорциональна напряженности электрического поля, это позволяет достичь усиления сигнала до  $1\times10^{11}$ , обеспечивая возможность детектирования отдельных молекул [185].

Из современной литературы известно небольшое количество исследований, посвященных применению ГКР-спектроскопии для анализа фенольных соединений в растительном сырье и продуктах его переработки. Например, в работе [184] авторы синтезировали подложку  $\text{Cu}_2\text{O}-\text{Ag}$  методом роста *in-situ* и разработали подход к определению общего содержания хлорогеновых кислот в растительных объектах (кофейные зерна, листья стевии, цветы японской жимолости) с помощью спектроскопии ГКР. Maiti N. и др.[186] применили метод спектроскопии ГКР для обнаружения следовых количеств хлорогеновой кислоты, адсорбированной на пленках с покрытием из наночастиц серебра с нижней границей определяемых содержаний –  $10^{-9}$  М.

Методы колебательной спектроскопии являются еще развивающимися, однако несмотря на небольшое количество исследований, они могут стать хорошей альтернативой более трудоемким классическим методам определения фенольных соединений в растительном сырье и пищевых продуктах. Тот факт, что данные методы являются неразрушающими, а для регистрации спектров не требуется пробоподготовка, еще больше упрощает возможности их применения.

# **Экспериментальная часть**

## **Глава 5. Исходные вещества, посуда, аппаратура, обработка результатов измерений, методики эксперимента**

### **5.1 Исходные вещества**

В работе использовали подсолнечный шрот холодного прессования, предоставленный НЦ «Бирюч-НТ», полученный из него белковый препарат (лабораторный образец) и три коммерческих образца подсолнечных белковых концентратов с заявлением содержанием белка 90%, 82.5% и 78%.

В качестве стандартного образца белка использовали бычий сывороточный альбумин («Sigma-Aldrich», США). Стандартный раствор БСА готовили растворением точной навески в воде при постоянном перемешивании.

В работе использовали следующие фенольные соединения: хлорогеновую кислоту, кофейную кислоту и хинную кислоту («Sigma-Aldrich», США).

Щелочной раствор для экстракции белка из подсолнечного шрота готовили растворением соответствующей навески гидроксида калия («Вектон», Россия) в воде ( $\text{pH} = 12$ ) с последующим разбавлением до  $\text{pH} 11$  и 10. Аммиачный раствор для экстракции готовили разбавлением 25%-ного раствора аммиака («Сигма Тек», Россия) водой до  $\text{pH} 12$  с последующим разбавлением до  $\text{pH} 11$  и 10.

0.01 М и 1 М растворы бисульфита натрия готовили растворением соответствующих точных навески твердой соли («Химмед», Россия) в воде.

Раствор 1 М хлороводородной кислоты готовили разбавлением точного объема концентрированной кислоты («Компонент-Реактив», Россия) в воде.

В работе использовали органические растворители: этанол («Химмед», Россия), гексан («Компонент-Реактив», Россия), толуол («Химмед», Россия) и нефрас («Рязанская нефтеперерабатывающая компания», Россия).

Двуокись углерода (степень чистоты 99.8%) применяли для осаждения белка с помощью барботирования.

Буфер Трис- $\text{HCl}$  («Ренам», Россия) и додецилсульфат натрия («Химмед», Россия) использовали для приготовления растворов при полимеризации концентрирующего и разделяющего гелей при проведении электрофореза. Для кипячения образцов перед фракционированием готовили растворы глицерина

(«Химмед», Россия), 2-меркаптоэтанола («Хеликон», Россия) и бромфенолового синего («ЛенРеактив», Россия) известных концентраций. Растворы хлорной кислоты («ЛенРеактив», Россия) и метанола («Химмед», Россия) использовали для фиксации геля.

Раствор красителя кумасси бриллиантовый синий G250 готовили растворением точной навески красителя («Biochem», Франция) в смеси 95%-ного этанола и 85%-ной фосфорной кислоты («Химмед», Россия).

Для приготовления реагента Бенедикта использовали точные навески цитрата натрия («Химмед», Россия), карбоната натрия («Химмед», Россия) и сульфата меди («Химмед», Россия), растворенные в воде.

Для БЦК-метода использовали набор реагентов Micro BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», США).

Для синтеза наночастиц магнетита, модифицированных хитозаном, использовали тетрагидрат хлорида железа (II) и гексагидрат хлорида железа (III) («Acros Organics», Бельгия), хитозан (Mr 50000-190000) («Sigma-Aldrich», США).

В работе использовали стандартные образцы трех фенольных соединений: хлорогеновой, кофейной и хиннной кислот («Acros organics», Германия).

Реактив Фолина-Чокальтеу («BDH Chemicals», Германия) использовали для определения фенольных соединений по одноименному методу.

Точные навески хлорида железа (III) («Renal», Венгрия) и гексацианоферрата (III) калия («Merck», Германия) использовали для получения «берлинской лазури».

0.1% ортофосфорную кислоту («Химмед», Россия) и ацетонитрил («Merck», Германия) использовали для приготовления подвижной фазы.

Бромид калия («Sigma-Aldrich», США) использовали для изготовления таблеток.

Хлорид гидроксиламина («Sigma-Aldrich», США), гидроксид натрия («Хеликон», Россия) и нитрат серебра («Sigma-Aldrich», США) использовали для синтеза наночастиц серебра.

В качестве основы для сенсорных подложек использовали медную фольгу толщиной 16 мкм («RoHS», Китай).

Для приготовления всех водных растворов использовали деионизованную воду с электропроводностью не менее 18.2 Мом·см, очищенную на установке «Milipore» (Франция).

## 5.2 Посуда и аппаратура

В работе использовали градуированные одноразовые пластиковые пробирки емкостью 2 мл («Eppendorf», Германия) и 5, 10 и 50 мл («Хеликон», Россия), стеклянную посуду (стаканы, мерные цилиндры, воронки, чашки Петри), эксикатор, ступки агатовые диаметром 40 мм и 160 мм с пестом, металлические шпатели. Для отбора малых объемов растворов использовали микропипетки («Biohit», Финляндия и «Eppendorf», Германия).

Измеряли pH растворов на pH-милливольтметре «Hanna Instruments» (Германия). Для взвешивания препаратов использовали аналитические весы «OHAUS» (Швейцария) с точностью измерения массы  $\pm 1 \times 10^{-4}$  г. Для растворения некоторых препаратов использовали ультразвуковую ванну («Сапфир», Россия). При проведении экстракции использовали магнитную мешалку с нагревателем и термопарой («IKA», Германия) и виброшайкер («Joanlab», Китай), а для отделения осадка –центрифугу для микропробирок («Eppendorf», Германия).

Лиофильную сушилку («LyoGene», Россия) использовали для сушки белковой пены.

Для фракционирования белков использовали систему для вертикального электрофореза («Bio-Rad», США).

В работе использовали анализатор Perkin Elmer 2400 Series II CHNS/O Elemental Analyzer («Perkin Elmer Corporation», США).

Поглощение растворов в УФ и видимой областях регистрировали с использованием спектрофотометра SPECTROstar Nano («BMG Labtech», Германия) с точностью  $\pm 0.002$  опт. ед. Для измерения поглощения использовали кварцевые кюветы объемом 1 мл (с длиной оптического пути 0.2 см и 1 см) и 96-луночные полистирольные микропланшеты с объемом лунки 300 мкл («Corning», США).

Использовали ВЭЖХ систему Agilent 1200 («Agilent Technologies», Германия) со спектрофотометрическим детектором (длина волны 326 нм при ширине спектральной полосы 4 нм), оснащенную колонкой Synergi Hydro-RP («Phenomenex», США) размером 150×4,6 мм и диаметром частиц сорбента 4 мкм.

Инфракрасные спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре Perkin Elmer SPECTRUM 3 («PerkinElmer», США) в режиме пропускания в диапазоне 2000-500 см<sup>-1</sup>.

Таблетки для КР-картирования формировали с помощью набора для прессования (9 мм) «PMY-B» (Китай). В качестве подложек использовали покровные стекла 24×24 мм<sup>2</sup> и 18×18 мм<sup>2</sup>, толщиной 0.15 мм («Deltalab», Испания).

Подготовку подложек осуществляли с использованием установки плазменной обработки УПО-12 (ООО «Микродатчик», Россия).

Исследования методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) проводили на конфокальном сканирующем рамановском спектрометре Horiba LabRam HR Evolution («HORIBA Ltd.», Япония), оснащенном линейно поляризованным лазером 514, 532, 632.8 и 785 нм, а также с помощью спектрометра Enspectr с использованием твердотельных лазеров с длинами волн 532 нм (50 мВт) и 785 нм (105 мВт) и рамановского комплекса на базе оптического микроскопа RM638 («Фотон-Био», Россия), использующего твердотельный лазер с длиной волны 638 нм (140 мВт).

### **5.3 Методики эксперимента**

#### **5.3.1 Методики получения белка из подсолнечного шрота**

##### *Выбор оптимальных условий извлечения белка*

Для определения оптимальных параметров извлечения белка провели ряд экспериментов при варьировании значений pH и гидромодуля. В этих условиях сравнили «классический» способ извлечения белка щелочным раствором [65] и разработанный подход, основанный на использовании аммиачного раствора.

Образцы подсолнечного шрота помещали в одноразовые пластиковые пробирки вместимостью 50 мл и растворяли в гидроксиде калия или аммиаке при варьировании значений pH и гидромодуля. Извлечение белка проводили в течение 30 минут при температуре 50-55°C и постоянном перемешивании, после чего растворы фильтровали через сито с размером ячеек 40 мкм. Осадок высушивали при температуре 60°C до постоянной массы и рассчитывали его содержание по формуле:

$$\omega = \frac{m_{\text{ост}}}{m_{\text{ш}}} \times 100\%,$$

где  $m_{osm}$  – масса твердого остатка, г;

$m_{ш}$  – масса навески шрота, г.

### ***Предотвращение окисления фенольных соединений***

С целью «защиты» белка от связывания с продуктами окисления фенольных соединений в условиях высоких значений pH и температуры в аммиачный раствор вносили антиоксидантный агент – бисульфит натрия.

К подсолнечному шроту прибавляли раствор, содержащий 0.01 М раствор бисульфита натрия, аммиак (конц.) и воду, тщательно перемешивали.

Для предотвращения автоокисления фенольных соединений при контакте с кислородом на стадии отделения твердого остатка к маточному раствору дополнительно прибавляли 1 М раствор бисульфита натрия.

### ***Повышение степени извлечения белка и сушка***

По «классическому» методу белок выделяли путем постепенного добавления к маточному раствору 1 М хлороводородной кислоты до достижения изоэлектрической точки (ИЭТ) при pH 4.5.

В разработанном подходе стадию осаждения в ИЭТ заменили на флотацию. К маточному раствору прибавляли органический растворитель (толуол, нефрас), смесь интенсивно встряхивали в течение 2 минут и оставляли до полного разделения фаз.

С целью увеличения эффективности флотации изучали зависимость сорбции белка на межфазной границе от pH маточного раствора, а также зависимость выхода белкового препарата от соотношения фаз.

В 5 экстракционных систем прибавляли 1 М раствор хлороводородной кислоты до достижения pH 7, 8, 9, 10 и 11. При выбранном значении pH готовили 5 новых экстракционных систем и прибавляли к ним органический растворитель (толуол, нефрас) в соотношении 1:0.75, 1:1, 1:1.25, 1:1.5 и 1:2, интенсивно встряхивали в течение 2 минут и оставляли до полного разделения фаз. После полного разделения фаз белковую пену отбирали и отправляли на лиофильную сушку.

### **5.3.2 Методики дополнительной очистки белка**

#### ***Промывка белковой пены***

Для промывки белковой пены использовали воду, этанол разной концентрации (от 20 до 80%) и органические растворители (нефрас, хлороформ). К белковой пене прибавляли растворитель в соотношении 1:1, интенсивно встряхивали и оставляли до полного осаждения белка, после чего его отбирали и отправляли на лиофильную сушку.

#### ***Барботирование углекислым газом***

5 мл белковой пены предварительно растворяли в щелочном растворе гидроксида калия с pH 11. В полученный раствор подавали CO<sub>2</sub> со скоростью 10 мл/мин в течение 30 минут, контролируя pH через 5, 10, 15 и 30 минут. Далее отбирали белковую пену и отправляли на лиофильную сушку.

#### ***Сверхкритическая флюидная CO<sub>2</sub>-экстракция***

Навеску 2.5 мг белкового препарата помещали в камеру для экстракции, вносили 25 мл этанола в качестве со-растворителя. Экстракцию проводили в течение 3 часов при начальном давлении 70 атм и температуре 40°C. После завершения экстракции отделяли водную фазу, а белок отправляли на лиофильную сушку.

### **5.3.3 Методики определения белка**

#### ***Электрофорез в полиакриламидном геле***

Электрофорез проводили в вертикальных пластинах геля (9×12×0.1 см) в условиях дискретного режима в линейном градиенте полиакриламида. Концентрирующий гель полимеризовали в 120 мМ Трис-HCl (pH 6.8) и 0.1% растворе додецилсульфата натрия. Разделяющий гель полимеризовали в 0.375 М Трис-HCl (pH 8.8) и 0.1% растворе додецилсульфата натрия. Перед электрофорезом образцы кипятили на водяной бане в течение 3 минут в буфере 60 мМ Трис-HCl (pH 6.8) с добавлением 2% додецилсульфата натрия, 10% глицерина, 5% 2-меркаптоэтанола, 0.001% бромфенолового синего.

Электрофорез проводили в 25 мМ Трис, 0.19 М глицин, 0.1% додецилсульфате натрия электродном буфере при постоянной силе тока 20 мА до вхождения белков в разделяющий гель и при 50 мА после этого.

После электрофореза гель фиксировали в растворе 5% хлорной кислоты и 50% метанола в течение 20 минут при 55°C, после чего промывали водой. Белковые полосы окрашивали раствором 0.04% красителя кумасси в 3.4% хлорной кислоте в течение 30 минут при 55°C. Несвязанный краситель отмывали водой при 90°C.

### ***Определение белка методом Дюма***

Определение белка проводили в соответствии с методикой [187] с использованием CHNS/O-анализатора. Образцы шрота, лабораторного и трех коммерческих образцов белка известной массы сжигали при температуре около 900°C в присутствии кислорода. Количество белка в исследуемых образцах определяли путем умножения содержания азота на стандартный коэффициент пересчета – 6.25 [188].

### ***Определение белка методом прямой спектрофотометрии***

Содержание белка в лабораторном и коммерческих образцах определяли в соответствии с методикой [117]. Готовили серию стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций 200-2000 мкг/мл, по значениям поглощения которых строили градуировочную зависимость. Серию исследуемых растворов готовили в концентрациях 800, 1200 и 1600 мкг/мл. В качестве растворителя использовали гидроксид калия с pH 11. Поглощение растворов регистрировали при длине волны 280 нм.

### ***Определение белка методом Брэдфорда***

10 мг красителя кумасси бриллиантового синего G-250 растворяли в 5 мл 95% этианола, прибавляли 10 мл 85%-ной фосфорной кислоты и разбавляли водой до 100 мл для получения реактива Брэдфорда [125].

Готовили серию стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций 10-100 мкг/мл, по значениям поглощения которых строили градуировочную зависимость. Серию исследуемых растворов готовили в концентрациях 40, 60 и 80 мкг/мл. В качестве растворителя использовали гидроксид калия с pH 11.

В лунке планшета смешивали 150 мкл раствора белка и 150 мкл раствора красителя, инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре и регистрировали спектры поглощения полученных растворов при длине волны 595 нм.

### ***Определение белка методом Бенедикта***

Для приготовления реактива Бенедикта по методике [189] 17.3 г цитрата натрия и 10 г карбоната натрия растворяли в 40 мл воды, прибавляли 1.73 г сульфата меди, предварительно растворенного в 10 мл воды, и доводили объем полученного раствора водой до 100 мл.

Готовили серию стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций 200-2000 мкг/мл, по значениям поглощения которых строили градуировочную зависимость. Серию исследуемых растворов готовили в концентрациях 800, 1200 и 1600 мкг/мл. В качестве растворителя использовали гидроксид калия с pH 11.

В лунке планшета смешивали 50 мкл раствора белка, 10 мкл реактива Бенедикта и 150 мкл 3% раствора гидроксида натрия, инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и измеряли поглощение при длине волны 330 нм.

### ***Определение белка с бицинхониновой кислотой (методом БЦК)***

1 мл *реагента B* и 50 мл *реагента A* из набора для проведения БЦК-анализа смешивали для получения рабочего раствора [129].

Готовили серию стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций 200-2000 мкг/мл, по значениям поглощения которых строили градуировочную зависимость. Серию исследуемых растворов готовили в концентрациях 800, 1200 и 1600 мкг/мл. В качестве растворителя использовали гидроксид калия с pH 11.

В лунку планшета вносили 25 мкл раствора белка, 200 мкл рабочего раствора и тщательно перемешивали на шейкере для планшетов в течение 30 секунд, после чего инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C и измеряли поглощение при длине волны 562 нм.

### ***Определение белка методом Лоури***

2 г карбоната натрия растворяли в 100 мл 0.1 н раствора гидроксида натрия для получения *реагента A*. 0.025 г сульфата меди растворяли в 50 мл 1 % раствора цитрата натрия для получения *реагента B*. 1 мл *реактива B* смешивали с 50 мл *реактива A* для получения рабочего раствора.

Определение белка проводили в соответствии с методикой [130], за исключением того, что тартрат натрия заменили на цитрат натрия [190]. Готовили серию стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций 10-100 мкг/мл, по

значениям поглощения которых строили градиуровочную зависимость. Серию исследуемых растворов готовили в концентрациях 40, 60 и 80 мкг/мл. В качестве растворителя использовали гидроксид калия с pH 11.

В лунку планшета вносили 40 мкл раствора белка, прибавляли 200 мкл рабочего раствора, инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем прибавляли 20 мкл 1 н реактива Фолина-Чокальтеу, перемешивали на шейкере для планшетов, инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре и измеряли поглощение при длине волны 760 нм.

### **5.3.4 Методики выделения фенольных соединений**

#### ***Синтез наночастиц магнетита, модифицированных хитозаном***

Наночастицы магнетита синтезировали методом соосаждения солей железа в щелочной среде [191]. К полученному раствору наночастиц добавляли 60 мл 2% раствора хитозана в уксусной кислоте и перемешивали в течение 30 мин со скоростью 1800 об/мин в атмосфере азота при температуре 60°C. Образовавшийся черный осадок модифицированных наночастиц магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP@CS}$ ) осаждали с помощью постоянного магнита, а надосадочную жидкость декантировали. Средний размер наночастиц составил 7.5 нм.

#### ***Извлечение фенольных соединений из водной фазы***

К 20 мл водной фазы добавляли известное количество  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NP@CS}$ . Извлечение фенольных соединений проводили при постоянном перемешивании, после чего наночастицы магнетита удаляли под действием внешнего магнитного поля. Исследовали влияние времени извлечения и количества добавки сорбента на степень извлечения фенольных соединений.

В качестве растворителя для десорбции фенольных соединений исследовали применение метанола, ацетонитрила и ацетона [192]. После отделения магнитных наночастиц с адсорбированными на их поверхности фенольными соединениями промывали их 5 мл растворителя и обрабатывали ультразвуком в течение 5 минут.

Общее содержание фенольных соединений в водной фазе определяли двумя спектрофотометрическими методами (Фолина-Чокальтеу и Берлинской лазури).

## *Извлечение фенольных соединений из подсолнечного шрота и белкового препарата*

Фенольные соединения из подсолнечного шрота извлекали водой, 20%, 50% и 80% этанолом (1:20 масс./об.) в течение 30 минут, после чего центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 минут и отделяли экстракт.

Для выбора оптимальных условий извлечения оценивали содержание фенольных соединений в полученных экстрактах с помощью двух спектрофотометрических методов (Фолина-Чокальтеу и Берлинской лазури).

Для определения фенольных соединений в лабораторном образце белка, его точную навеску растворяли в растворе гидроксида калия с pH 11, после чего нерастворимую фракцию отделяли с помощью центрифугирования при 12000 об./мин в течение 10 минут.

### **5.3.5 Методики определения фенольных соединений методами спектрофотометрии**

#### *Определение общего содержания фенольных соединений методом Фолина-Чокальтеу*

Для построения градуировочной зависимости в лунку микропланшета последовательно вносили 60 мкл стандартного раствора хлорогеновой кислоты (концентрация от 10 до 50 мкг/мл), 60 мкл 2 н реактива Фолина-Чокальтеу и 60 мкл воды. Через 15 минут к смеси прибавляли 120 мкл 10%-ного раствора карбоната натрия. Затем смесь оставляли при комнатной температуре в темноте на 1 час для протекания реакции. Спектры поглощения растворов регистрировали при 760 нм с помощью микропланшетного ридера.

Для определения фенольных соединений в образце шрота в лунку микропланшета последовательно добавляли 60 мкл экстракта подсолнечного шрота (разбавленного в 100 раз) или белковой вытяжки (разбавленной в 10 раз), 60 мкл 2 н реактива Фолина-Чокальтеу и 60 мкл воды. Далее процедура анализа аналогична описанной выше.

## ***Определение общего содержания фенольных соединений методом Берлинской лазури***

Для построения градуировочной зависимости в лунку микропланшета вносили 100 мкл стандартного раствора хлорогеновой кислоты (концентрация от 10 до 50 мкг/мл), 100 мкл 0.4 mM раствора хлорида железа (III) и 100 мкл 0.36 mM раствора гексацианоферрата (III) калия. Затем микропланшет инкубировали при комнатной температуре в течение 25 минут для протекания реакции. Спектры поглощения растворов регистрировали при 700 нм с помощью микропланшетного ридера.

Для определения фенольных соединений в образце в лунку микропланшета добавляли 100 мкл экстракта подсолнечного шрота (разбавленного в 100 раз) или белковой вытяжки, 100 мкл 0.4 mM раствора хлорида железа (III) и 100 мкл 0.36 mM раствора гексацианоферрата (III) калия. Далее процедура анализа аналогична описанной выше.

### **5.3.6 Методики определения фенольных соединений методом ВЭЖХ**

Для приготовления подвижной фазы смешивали 0.1% ортофосфорную кислоту и ацетонитрил в соотношении 80% : 20%.

Для приготовления модельного раствора по 1.0 мг навески стандартного образца хлорогеновой, кофейной и хинной кислот помещали в мерные колбы вместимостью 100 мл, растворяли в подвижной фазе и доводили тем же растворителем до метки. По 1 мл каждого раствора вносили в колбу вместимостью 25 мл, доводили до метки подвижной фазой.

Для построения градуировочной зависимости 1.0 мг стандартного образца хлорогеновой кислоты помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяли в 20 мл подвижной фазы, доводили объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивали. Концентрация хлорогеновой кислоты в стандартном растворе – 10 мкг/мл.

0.5; 2.0; 5.0; 7.5 и 10.0 мл стандартного раствора хлорогеновой кислоты вносили в мерные колбы вместимостью 10 мл, доводили объем растворов до метки подвижной фазой и перемешивали. Концентрация стандартных растворов хлорогеновой кислоты – от 0.5 до 10 мкг/мл.

Для приготовления испытуемого раствора 0.5 мл экстракта шрота или белковой вытяжки, полученные согласно методике в п. 2.3.5, вносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора до метки подвижной фазой и перемешивали.

Последовательно хроматографировали раствор подвижной фазы, пять градуировочных растворов и испытуемые растворы.

### **5.3.7 Методика определения фенольных соединений методом ИК-спектроскопии**

#### ***Регистрация ИК-спектров стандартных образцов фенольных кислот***

2 мг хлорогеновой кислоты и 148 мг KBr смешивали и измельчали в ступке, после чего уплотняли в форме таблетки диаметром 9 мм с помощью прессования, прикладывая одноосное давление 2 атмосферы (~200 кПа) в течение 2 минут. Аналогичную пробоподготовку проводили для кофейной кислоты.

#### ***Регистрация ИК-спектров хлорогеновой кислоты в матрице БСА***

1, 2, 4, 10 и 20 мг хлорогеновой кислоты и 199, 198, 196, 190, 180 мг БСА, соответственно, смешивали и измельчали в ступке для получения модельных образцов с массовым содержанием хлорогеновой кислоты – 0.5%, 1%, 2%, 5% и 10%. 2 мг каждого модельного образца и 148 мг KBr смешивали и измельчали в ступке, после чего формировали таблетки с помощью прессования и регистрировали ИК-спектры исследуемых образцов. Для построения градуировочной зависимости рассчитывали интегральные значения поглощения каждого модельного образца для характеристической полосы в области  $1560\text{ cm}^{-1}$ .

#### ***Регистрация ИК-спектров хлорогеновой кислоты в матрице подсолнечного шрота***

1, 2, 4, 10 и 20 мг хлорогеновой кислоты и 199, 198, 196, 190 и 180 мг подсолнечного шрота, соответственно, смешивали и измельчали в ступке для получения модельных образцов с массовым содержанием хлорогеновой кислоты – 0.5%, 1%, 2%, 5% и 10%. 2 мг каждого модельного образца и 148 мг KBr смешивали и измельчали в ступке, после чего формировали таблетки с помощью прессования и регистрировали ИК-спектры исследуемых образцов. Для построения

градуировочной зависимости рассчитывали интегральные значения поглощения каждого модельного образца для характеристической полосы в области  $1560\text{ см}^{-1}$ .

### **5.3.8 Методика определения фенольных соединений методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР)**

#### *Регистрация КР-спектров стандартных образцов фенольных кислот*

На предметное стекло помещали около 10 мг стандартного образца хлорогеновой, кофейной и хинной кислот и регистрировали их КР-спектры с использованием лазеров с длинами волн возбуждения: 514 нм, 532 нм и 785 нм. Время накопления сигнала варьировали от 3 до 10 секунд, количество накоплений – от 1 до 10, мощность лазера – от 1 до 100%.

#### *Регистрация КР-спектров фенольных кислот в матрице БСА и КР-картирование для построения градуировочной зависимости*

1, 2, 4, 10 и 20 мг хлорогеновой кислоты и 199, 198, 196, 190, 180 мг БСА, соответственно, смешивали и измельчали в ступке для получения модельных смесей с массовым содержанием хлорогеновой кислоты – 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%. Регистрировали КР-спектры модельных образцов с помощью лазеров с длинами волн 514, 532 и 785 нм. Время накопления сигнала варьировали от 3 до 10 секунд, количество накоплений – от 1 до 10, мощность лазера – от 1 до 100% для выбора оптимальных условий.

Для проведения КР-картирования полученные модельные образцы уплотняли в форме таблетки диаметром 9 мм с помощью прессования, прикладывая одноосное давление 2 атмосферы ( $\sim 200\text{ кПа}$ ) в течение 2 минут. КР-картирование проводили по 100 точкам ( $10 \times 10$ ) с шагом 555 мкм с использованием лазера с длиной волны 532 нм. Время накопления сигнала составило 10 секунд, количество накоплений – 2. Аналогичную пробоподготовку и картирование проводили для кофейной кислоты.

Для построения градуировочной зависимости рассчитывали интегральные значения поглощения каждого модельного образца для характеристической полосы в области  $1605\text{ см}^{-1}$  для хлорогеновой кислоты и  $1300\text{ см}^{-1}$  для кофейной кислоты.

## ***Регистрация ГКР-спектров хлорогеновой кислоты в матрице подсолнечного шрота***

1, 2, 4, 10 и 20 мг хлорогеновой кислоты и 199, 198, 196, 190, 180 мг подсолнечного шрота, соответственно, смешивали и измельчали в ступке для получения модельных смесей с массовым содержанием хлорогеновой кислоты – 0.5%, 1%, 2%, 5%, 10%. Дальнейшая процедура аналогична описанной выше для модельных образцов с БСА.

### **5.3.9 Методика определения фенольных соединений методом ГКР-спектроскопии**

#### ***Синтез наночастиц серебра***

15 мг хлорида гидроксиламина и 20 мг гидроксида натрия смешивали и растворяли в 90 мл деионизованной воды. К полученному раствору постепенно (по 1 мл) вносили 10 мл 0.01 М раствора нитрата серебра при постоянном перемешивании [193]. Непосредственно перед использованием раствор помещали на 5 минут в ультразвуковую баню для равномерного распределения наночастиц в объеме, после чего концентрировали частицы в 4 раза (10000 об/мин, 10 минут).

#### ***Регистрация ГКР-спектров стандартных образцов фенольных кислот***

Для приготовления исходных стандартных растворов хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты соответствующие навески растворяли в 50% этиловом спирте ( $C_{usx} = 1 \times 10^{-3}$  моль/л). Серию градуировочных растворов (от  $1 \times 10^{-3}$  до  $1 \times 10^{-4}$  моль/л) готовили последовательным разбавлением исходных стандартных растворов тем же растворителем.

На пластину, покрытую медной фольгой, наносили 1.5 мкл наночастиц серебра (AgNP), дожидались их высыхания и прибавляли 1.5 мкл градуировочного раствора хлорогеновой кислоты, после чего оставляли систему на 15-20 минут до полного высыхания капли. ГКР-спектры регистрировали с использованием лазера с длиной волны 638 нм. Время накопления сигнала варьировали от 1 до 10 секунд, количество накоплений – от 1 до 10, мощность лазера – от 1 до 100%. Аналогичную пробоподготовку и регистрацию ГКР-спектров проводили для кофейной и кислоты.

## 5.4 Обработка результатов

Результаты экспериментов обрабатывали с применением методов математической статистики. Использовали следующие обозначения:

$$\bar{x} - \text{среднее для ряда из } n \text{ измерений}, \bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

$$V(x) - \text{дисперсия}, V(x) = s^2(x) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1},$$

$$s(x) - \text{стандартное отклонение}, s(x) = \sqrt{V(x)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}},$$

$$s_r(x) - \text{относительное стандартное отклонение}, s_r(x) = \frac{s(x)}{\bar{x}},$$

$$\Delta x - \text{доверительный интервал}, \Delta x = \frac{t(P, f) \cdot s(x)}{\sqrt{n}}.$$

Нижнюю границу определяемых содержаний ( $C_{\min}$ ) характеризовали минимальной определяемой концентрацией при заданной доверительной вероятности.

Для обработки полученных данных использовали программу «Excel 2019». Обработку спектров КР и ГКР (вычитание интенсивности фона и последующую корректировку сигналов) и ИК-спектров проводили с помощью программы «OriginPro 2018», которая включала в себя вычитание интенсивности фона с последующим интегрированием характеристических пиков. Площадь характеристических пиков была выбрана в качестве аналитического сигнала.

# **Обсуждение результатов**

## **Глава 6. Разработка подхода к выделению белка из подсолнечного шрота**

### **6.1 Выбор оптимальных условий извлечения белка и отделения нерастворимого осадка**

При выборе оптимальных условий извлечения основной задачей было увеличение количества белка, переводимого в раствор из подсолнечного шрота. На основании литературных данных извлечение проводили в течение 30 минут при температуре 50-55°C во избежание денатурации белка. Традиционно, в качестве растворителя используют щелочной раствор гидроксида калия. В работе изучена возможность замены гидроксида калия на аммиачный раствор. Это должно способствовать уменьшению солевых стоков, так как аммонийные соли можно использовать в виде удобрений или разлагать термически, возвращая аммиак обратно в процесс.

Для отделения нерастворимого осадка от маточного раствора белка сравнивали два способа: центрифugирование и фильтрацию через сито. Центрифугирование оказалось неэффективным, так как не удалось подобрать такие параметры (скорость, время), чтобы белок оставался в растворе, а волокна и другие твердые частицы осаждались. Эффективного удаления твердого остатка удалось достичь при использовании сита с диаметром пор 40 мкм (40-50 мкм – средний размер растительных волокон).

Сравнивали извлечение белка при использовании раствора гидроксида калия и аммиачного раствора при варьировании основных параметров: pH и гидромодуля. После завершения извлечения и последующего отделения твердого остатка наблюдали изменение окраски полученных маточных растворов (**рисунок 22**).



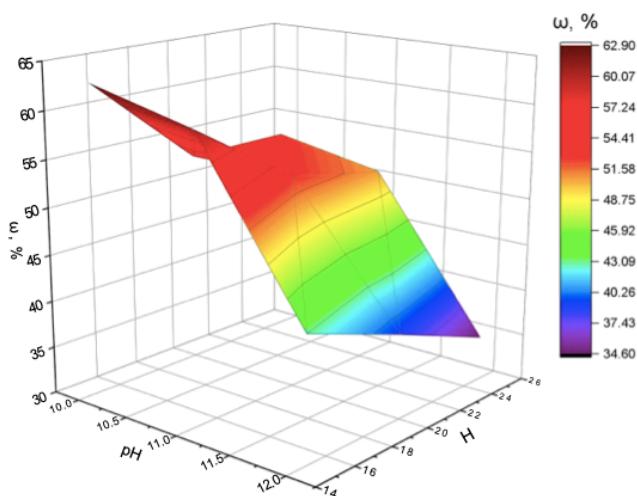
**Рисунок 22.** Маточные растворы, полученные в результате извлечения белка  
а) раствором гидроксида калия, б) аммиачным раствором.

Образцы, полученные при использовании в качестве растворителя гидроксида калия, имели кремовую окраску (за исключением образца, полученного при гидромодуле 25 и pH 12), а образцы маточных растворов, полученные при использовании аммиачного раствора, имели окраску от кремового до зеленого цвета в зависимости от значения pH. Эффективность извлечения белка оценивали по содержанию твердого остатка после его отделения. В **таблице 4** представлены результаты расчета содержания твердого остатка в 9 образцах после извлечения белка раствором гидроксида калия, а на **рисунке 23** – 3Д-диаграмма зависимости содержания твердого остатка от ключевых параметров процесса.

**Таблица 4.** Содержание твердого остатка в образцах после извлечения белка гидроксидом калия ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Масса навески шрота, г	Объем раствора, мл	pH	Гидромодуль	Содержание твердого остатка, %
2.0003	30	12	15	43 ± 1
2.0011	40		20	39 ± 1
2.0007	50		25	34 ± 2

1.9996	30	11	15	$60 \pm 1$
2.0009	40		20	$52 \pm 3$
1.9987	50		25	$50 \pm 1$
2.0010	30	10	15	$62 \pm 1$
2.0005	40		20	$52 \pm 2$
2.0014	50		25	$52 \pm 1$



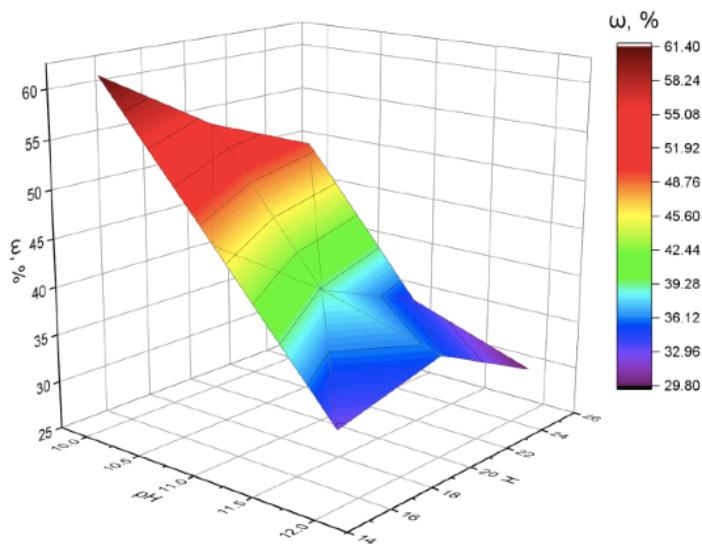
**Рисунок 23.** 3Д-диаграмма зависимости содержания твердого остатка от гидромодуля и pH (извлечение белка раствором гидроксида калия).

Аналогичные результаты расчета содержания твердого остатка для образцов после извлечения белка раствором аммиака представлены в **таблице 5**, а зависимость содержания твердого остатка от параметров извлечения – на **рисунке 24**.

**Таблица 5.** Содержание твердого остатка в образцах после извлечения белка аммиачным раствором ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Масса навески шрота, г	Объем раствора, мл	pH	Гидромодуль	Масса твердого остатка, г	Содержание твердого остатка, %
2.0018	30	12	15	0.6541	$32 \pm 1$
2.0002	40		20	0.7112	$35 \pm 2$
1.9997	50		25	0.5962	$29 \pm 1$

2.0005	30	11	15	0.9422	$47 \pm 1$
1.9999	40		20	0.7830	$39 \pm 1$
2.0009	50		25	0.6848	$34 \pm 1$
2.0015	30	10	15	1.2276	$61 \pm 2$
2.0007	40		20	1.0838	$54 \pm 2$
1.9994	50		25	0.9908	$49 \pm 1$



**Рисунок 24.** 3Д-диаграмма зависимости содержания твердого остатка от гидромодуля и pH (извлечение белка раствором аммиака).

Как видно из таблиц 4 и 5, с увеличением значений pH и гидромодуля сокращается содержание твердого остатка и, следовательно, увеличивается количество белка, переводимого в раствор. При этом, использование гидромодуля выше 25 нецелесообразно в связи со значительным увеличением солевых стоков и сложностями их утилизации. Вместе с тем нежелательно использовать и pH 12, так как помимо явного связывания белка с продуктами окисления фенольных соединений (появление зеленой окраски), возможна денатурация белка в сильнощелочных условиях.

Результаты содержания твердого остатка в образцах после извлечения белка раствором аммиака коррелируют с данными, полученными для образцов после извлечения раствором гидроксида калия: с ростом pH и гидромодуля увеличивается количество белка, переводимого в раствор.

С целью получения изолятов кремового цвета оптимальными условиями выбраны pH 11 и гидромодуль 25. Однако при использовании аммиачного раствора (**рисунок 22б**) образование зеленого пигмента наблюдается уже при pH 11, что может быть связано с особенностями аммиака, который, как сильное основание Льюиса, ускоряет окисление и димеризацию фенолов. В связи с этим, важной задачей являлся поиск путей «защиты» белка от связывания с фенольными соединениями на стадии извлечения белка из шрота. Для этого изучали добавление антиоксидантов, разрешенных в пищевой промышленности, и выбрали бисульфит натрия в связи с его минимальной молекулярной массой. Подбирали такие условия, при которых бы достигался pH раствора на уровне 11, и при этом концентрации антиоксиданта хватало для предотвращения окисления фенольных соединений. Внесение его небольшого количества в щелочной раствор позволяло временно предотвратить нежелательное окисление фенолов.

## **6.2 Выбор условий выделения белка: сравнение эффективности осаждения и флотации**

Выделяли белок из маточных растворов параллельно двумя способами: осаждением в изоэлектрической точке (ИЭТ) при pH около 4.5 и флотацией с помощью различных органических растворителей (гексан, толуол, нефрас). Наиболее подходящим (по плотности белковой пены) оказался толуол. Исследовали 4 системы: извлечение гидроксидом калия, гидроксидом калия с добавлением антиоксиданта, аммиачным раствором, аммиачным раствором с добавлением антиоксиданта.

После стадии извлечения белка отделяли твердый остаток, вносили антиоксидант, а затем из 4 образцов выделение белка осуществляли осаждением в ИЭТ, а еще из 4 образцов – флотацией с помощью толуола. После отбора белка отправляли его на лиофильную сушку. Эффективность способа выделения оценивали по выходу конечного белкового продукта. Результаты представлены в **таблице 6**.

Так, не только замена осаждения на флотацию, но и замена гидроксида калия на аммиак, а также внесение антиоксиданта после фильтрации позволяет значительно сократить потери белка (уменьшение содержания твердого остатка) и увеличить выход конечного белкового продукта.

**Таблица 6.** Сравнение результатов выделения белка методами осаждения в ИЭТ и флотации ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Способ выделения белка	Исследуемая система	Содержание твердого остатка, %	Выход белкового продукта, %
Флотация	KOH	43 ± 1	10 ± 1
	KOH + NaHSO <sub>3</sub>	32 ± 1	24 ± 1
	NH <sub>3</sub>	27 ± 1	66 ± 1
	NH <sub>3</sub> + NaHSO <sub>3</sub>	28 ± 2	68 ± 1
Осаждение в ИЭТ	KOH	46 ± 1	25 ± 1
	KOH + NaHSO <sub>3</sub>	34 ± 1	46 ± 1
	NH <sub>3</sub>	28 ± 1	37 ± 1
	NH <sub>3</sub> + NaHSO <sub>3</sub>	27 ± 1	66 ± 1

Так как толуол является токсичным реагентом и частично ограничен в использовании в пищевой промышленности, в последующем было принято решение о его замене на нефрас, использующийся при экстракции масла из семян подсолнечника. Результаты выхода белкового продукта после замены толуола на нефрас представлены в **таблице 7**.

**Таблица 7.** Выход белка при сравнении флотации толуолом и нефрасом ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

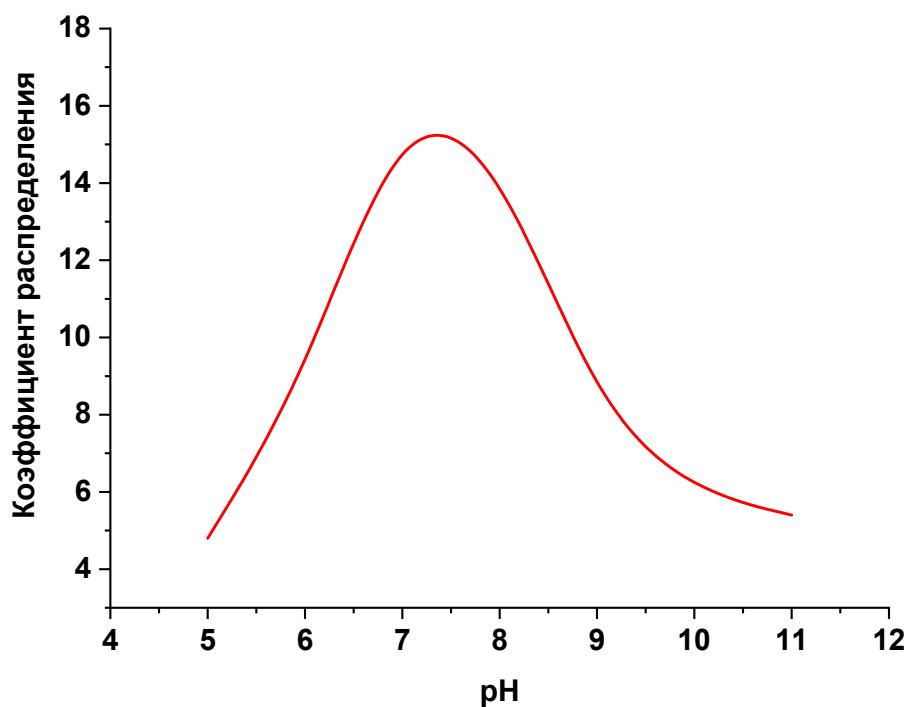
Выход белка, %					
Флотация с использованием толуола			Флотация с использованием нефраса		
61	60	62	61	60	60
61 ± 3			60 ± 2		

Для повышения эффективности флотации изучали зависимость сорбции белка от pH маточного раствора (от 5 до 11), а также выбирали оптимальное соотношения фаз маточный раствор : нефрас.

Для оценки эффективности флотации рассчитывали коэффициент распределения и степень извлечения белка (**рисунок 25**). Содержание белка в водной фазе определяли с помощью спектрофотометрического метода Лоури. Результаты представлены в **таблице 8**.

**Таблица 8.** Влияние pH маточного раствора на степень извлечения белка ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

pH маточного раствора	Содержание белка в водной фазе, мг/мл	Коэффициент распределения	Степень извлечения, %
5	27 ± 1	4.8	82 ± 1
6	16 ± 1	8.9	90 ± 2
7	9 ± 1	16.2	94 ± 1
8	10 ± 1	14.7	93 ± 2
9	18 ± 1	8.1	89 ± 1
10	23 ± 1	6.0	86 ± 1
11	25 ± 1	5.4	84 ± 3



**Рисунок 25.** Зависимость коэффициента распределения от pH маточного раствора.

Из полученных данных можно сделать вывод, что оптимальным pH для выделения белка является 7, при котором степень извлечения достигает  $(94 \pm 1)\%$ .

Выбор соотношения фаз осуществляли визуально по высоте столба белковой пены и по выходу белкового продукта. Результаты представлены в **таблице 9**.

**Таблица 9.** Зависимость выхода белка от соотношения фаз ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

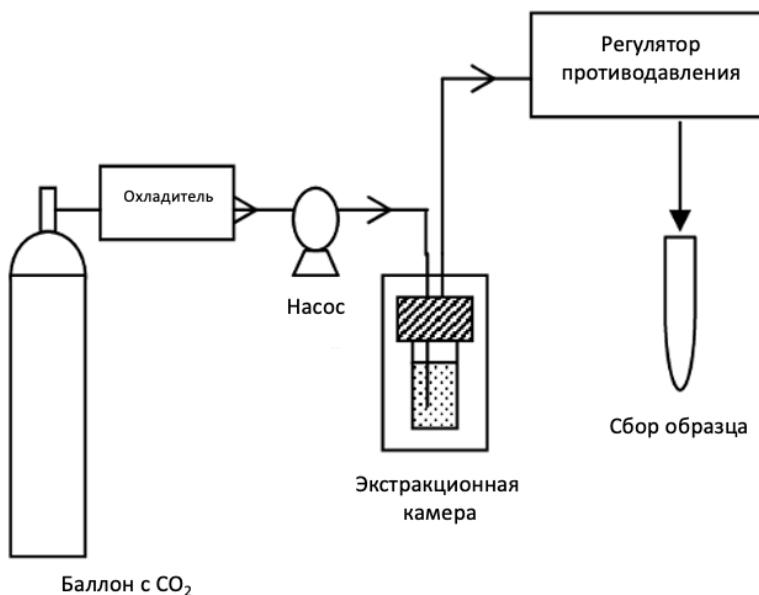
Соотношение фаз маточный раствор : нефрас	Выход белкового препарата, %
1 : 0.75	52 ± 3
1 : 1	63 ± 2
1 : 1.25	58 ± 3
1 : 1.5	26 ± 2
1 : 2	11 ± 2

Максимальный выход белкового продукта достигался при соотношении фаз маточный раствор : нефрас – 1:1 и составлял (63 ± 2) %.

### 6.3 Выбор условий дополнительной очистки белка

С целью получения изолятов с более высоким содержанием белка дополнительно очищали белковый продукт с помощью промывки растворителями (водой, этанолом, нефрасом, хлороформом), барботированием углекислым газом и сверхкритической флюидной СО<sub>2</sub>-экстракцией.

Особо перспективным и экологически чистым методом является сверхкритическая флюидная СО<sub>2</sub>-экстракция (СФЭ). При повышении давления и температуры до значений выше сверхкритических, происходил резкое изменение свойств диоксида углерода, в частности, увеличение его растворяющей способности (рисунок 26). Кроме того, для проведения СФЭ не требуется использование токсичных органических растворителей, полное удаление которых из целевого продукта невозможно. Условия проведения сверхкритической экстракции приведены в таблице 10.



**Рисунок 26.** Схема установки для сверхкритической флюидной CO<sub>2</sub>-экстракции.

**Таблица 10.** Условия проведения СФЭ

Масса загрузки белкового препарата	25 мг
Объем со-растворителя (этанола)	2.5 мл
Давление CO <sub>2</sub> при 25°C	70 атм
Температура экстракции	40°C
Продолжительность экстракции	3 ч

Образцы лабораторных белковых препаратов, полученные после дополнительной очистки, отправляли на лиофильную сушку, после чего определяли содержание белка с помощью азотометрического метода Дюма. Результаты представлены в **таблице 11**.

**Таблица 11.** Сравнение результатов дополнительной очистки белка разными способами ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

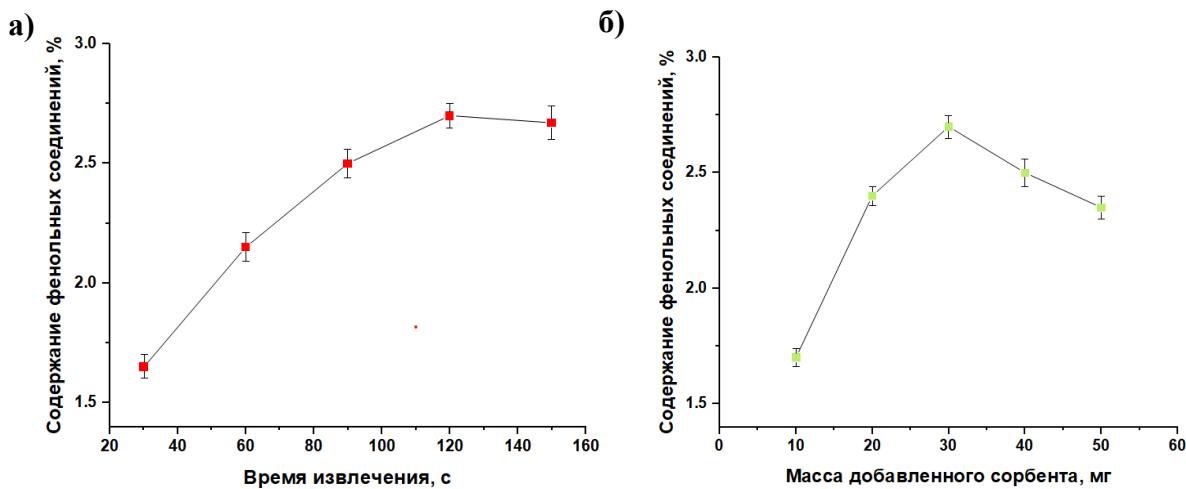
Способ очистки	Содержание белка, %
Без дополнительной очистки	$56 \pm 1$
Промывка водой	$68 \pm 1$
Промывка 20% этанолом	$74 \pm 1$
Барботирование CO <sub>2</sub>	$67 \pm 1$
Сверхкритическая флюидная CO <sub>2</sub> -экстракция	$96 \pm 1$

## **6.4 Выделение фенольных соединений из водной фазы после стадии флотации**

Помимо выделения белка из подсолнечного шрота рассмотрели возможность введения в разработанную технологическую схему стадии извлечения фенольных соединений с целью их дальнейшего использования для создания новых продуктов с добавленной стоимостью. Такой подход позволил бы решить проблему с/х отходов, приблизившись к модели идеального замкнутого цикла. В рамках данного исследования для извлечения фенольных соединений использовали наночастицы магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), модифицированные хитозаном, для селективного связывания с фенольными соединениями. Кроме того известно, что хитозан способен связывать как восстановленные, так и окисленные формы фенольных соединений, что могло способствовать большей степени очистки белкового препарата [198].

Одними из основных факторов, влияющих на эффективность извлечения, являются время проведения процесса и количество сорбента. Для определения оптимального времени извлечения фенольных соединений из водной фазы ( $\text{pH} 4.5$ , поскольку именно при этом значении белок наименее растворим, а снижение ниже указанного значения  $\text{pH}$  могло повысить эффективность извлечения фенольных соединений, но приводило бы к денатурации белка и как следствие к ухудшению его питательных свойств) изучали периоды перемешивания в течение 30, 60, 90, 120 и 150 секунд. Как видно на рисунке 27а при увеличении времени перемешивания до 120 секунд степень извлечения фенольных соединений достигала максимальной.

При исследовании влияния количества сорбента в диапазоне 10-50 мг (на 20 мл объема водной фазы) на эффективность извлечения фенольных соединений установили, что она растет при увеличении количества магнитных наночастиц от 10 до 30 мг и сокращается при добавлении больше 30 мг (рисунок 27б), что может быть связано с агрегацией избыточного количества наночастиц.



**Рисунок 27.** Влияние на эффективность извлечения фенольных соединений из водной фазы а) времени извлечения; б) количества магнитных наночастиц.

В связи с этим, оптимальными условиями выделения фенольных соединений из водной фазы выбрали извлечение в течение 60 секунд при добавлении 30 мг магнитных наночастиц. После завершения процесса извлечения, к раствору подносили внешний магнит для отделения магнитных наночастиц с абсорбированными на их поверхности фенольными соединениями.

Фенольные соединения десорбировали 5 мл метанола, ацетонитрила и ацетона при обработке ультразвуком в течение 5 минут. Из результатов, представленных в таблице 12, можно сделать вывод, что метанол проявляет наиболее сильную десорбционную способность. Однако так как целевым направлением использования фенольных соединений, которые извлекаются на данной стадии, является пищевая и фармацевтическая промышленность, применение данного растворителя при дальнейшем масштабировании подхода невозможно. Замена метанола на этанол не была эффективной для дальнейшего применения в указанной технологии, поскольку его более низкая летучесть по сравнению с метанолом затрудняла и удлиняла процесс дистилляции.

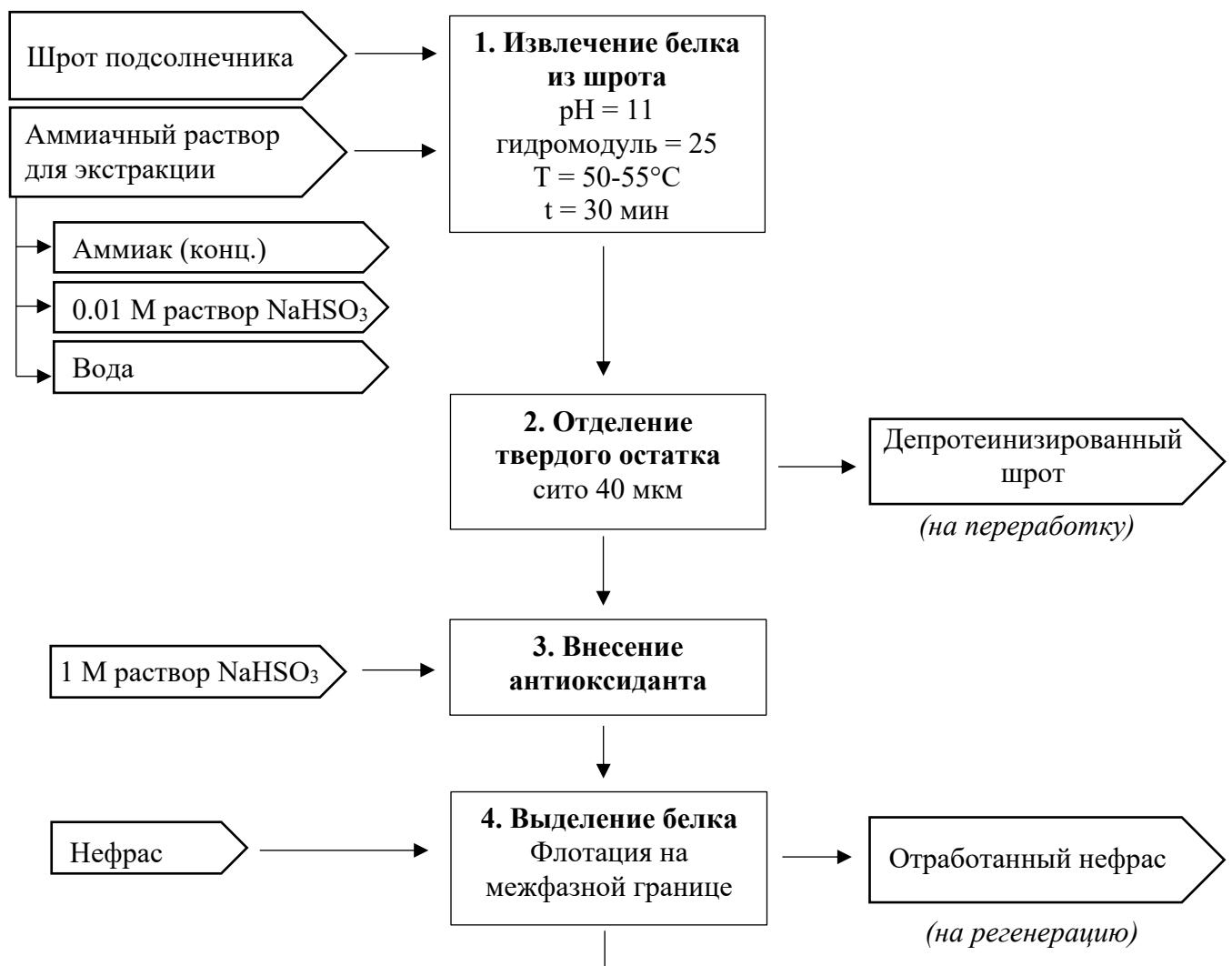
**Таблица 12.** Влияние типа растворителя на процесс десорбции

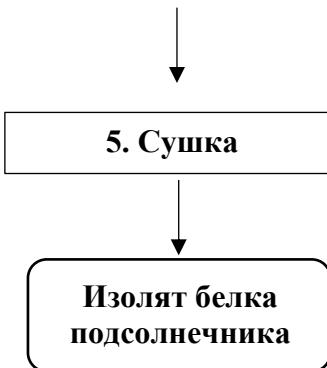
Используемый для десорбции растворитель	Содержание фенольных соединений, %
Метанол	$2.7 \pm 0.1$
Ацетонитрил	$2.1 \pm 0.1$
Ацетон	$2.4 \pm 0.1$

Несмотря на то, что предложенный подход демонстрирует потенциал интегрирования стадии извлечения фенольных соединений при выделении белка из подсолнечного шрота, полученные результаты показывают, что эффективность извлечения не является полной – часть фенольных соединений остается в водной фазе. Данное явление, вероятнее всего, обусловлено сложностью исследуемой матрицы: в водной фазе могут одновременно присутствовать полисахариды и остатки белков, которые способны связываться с активными центрами функционализированных наночастиц, снижая их эффективность для извлечения фенольных соединений. Кроме того, агрегация наночастиц при масштабировании всего процесса (в 10 раз) приводила к их быстрой седиментации и загрязнению белкового изолята.

## 6.5 Схема получения белка из подсолнечного шрота

Принципиальная блок-схема процесса получения белка из подсолнечного шрота представлена на **рисунке 28**.





**Рисунок 28.** Краткая блок-схема получения белка.

Таким образом, предложенный подход к получению белка из шрота подсолнечника имеет ряд преимуществ по сравнению с «классическим»:

1. Использование аммиачного раствора вместо гидроксида калия позволяет сократить количество солевых стоков.
2. Предварительное внесение антиоксиданта (бисульфита натрия) на стадии извлечения белка предотвращает окисление фенольных соединений в условиях высоких значений pH и температуры.
3. Добавление антиоксиданта после отделения твердого остатка позволяет получить конечный продукт кремового цвета, что свидетельствует об отсутствии или следовых количествах фенольных соединений.
4. Замена стадии осаждения белка в ИЭТ на флотацию увеличивает степень извлечения белка до  $(94 \pm 1)\%$ .
5. С помощью дополнительной очистки белка сверхкритической флюидной CO<sub>2</sub>-экстракцией возможно получить конечный белковый препарат высокой степени чистоты – около 96%.

## **Глава 7. Методы контроля качества белка подсолнечника**

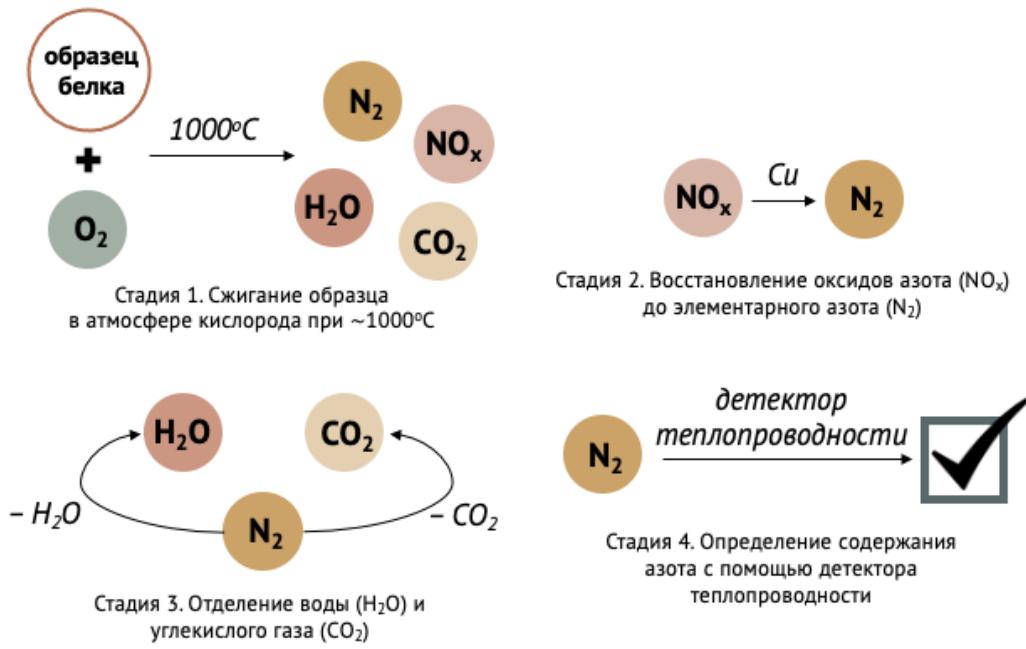
### **7.1 Методы определения белка**

Определение белка в исходном сырье и образцах, полученным с использованием описанного подхода, проводили азотометрическим методом Дюма и спектрофотометрическими методами (прямой спектрофотометрический метод, метод Брэдфорда, метод Бенедикта, метод с бицинхониновой кислотой и метод Лоури). Кроме того, эти же методы использовали для анализа трех коммерческих образцов подсолнечного протеина.

#### **7.1.1 Азотометрические методы**

Классическим методом анализа белка в пищевой промышленности является метод Кельдаля, основанный на определении общего азота с последующим пересчетом на содержание белка с помощью соответствующих коэффициентов. Однако этот метод сложен в исполнении, занимает несколько часов и требует использования токсичных химических реагентов.

В работе для определения общего азота использовали более простой и автоматизированный метод Дюма. На первой стадии образец сжигали в атмосфере кислорода при температуре около 1000°C, в результате чего образовывалась вода, углекислый газ, азот и смесь оксидов азота. Затем оксиды азота восстанавливались до элементарного азота на медной поверхности, отделялась вода и углекислый газ. На последнем этапе с помощью детектора теплопроводности определяли содержание азота в пробе (**рисунок 29**).



**Рисунок 29.** Схема определения общего азота по методу Дюма.

**Таблица 13.** Содержание азота в образцах, определенное по методу Дюма, с пересчетом на содержание белка ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

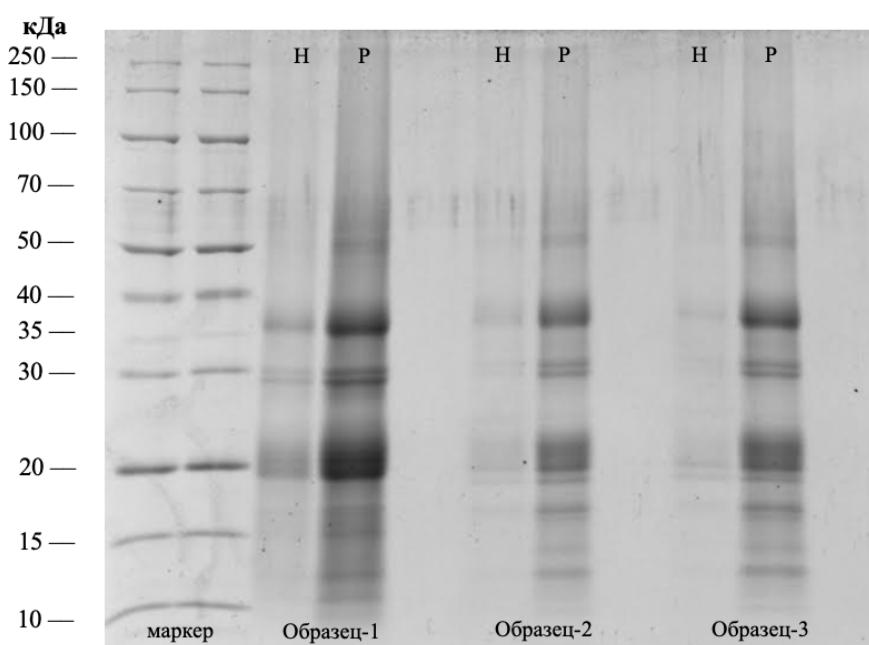
Образец	Содержание азота, %	Содержание белка, %
Подсолнечный шрот	8 ± 1	50 ± 1
Лабораторный образец	8 ± 1	50 ± 1
Коммерческий образец-1 (90%)	14 ± 1	88 ± 1
Коммерческий образец-2 (82.5%)	8 ± 1	50 ± 1
Коммерческий образец-3 (78%)	13 ± 1	81 ± 1

Общий недостаток азотометрических методов заключается в том, что они определяют азот независимо от того, является ли он органическим и входит в состав молекул белка или привнесен в продукт с посторонним азотсодержащим веществом. Как видно из полученных результатов (таблица 13), для коммерческого образца-2 с помощью метода Дюма получили заниженный результат содержания белка по сравнению с заявленным производителем.

## 7.1.2 Биохимические методы

### Электрофорез в полиакриламидном геле

Фракционирование белков проводили для растворимой и нерастворимой фракции трех коммерческих образцов белка подсолнечного шрота. Как видно на **рисунке 30**, все образцы содержат белки двух типов – солерасторимые глобулины и водорастворимые альбумины разной молекулярной массы, а пептидные полосы схожи у всех трех образцов протеина.



**Рисунок 30.** Электрофорез растворимой (Р) и нерастворимой (Н) фракций подсолнечных белков

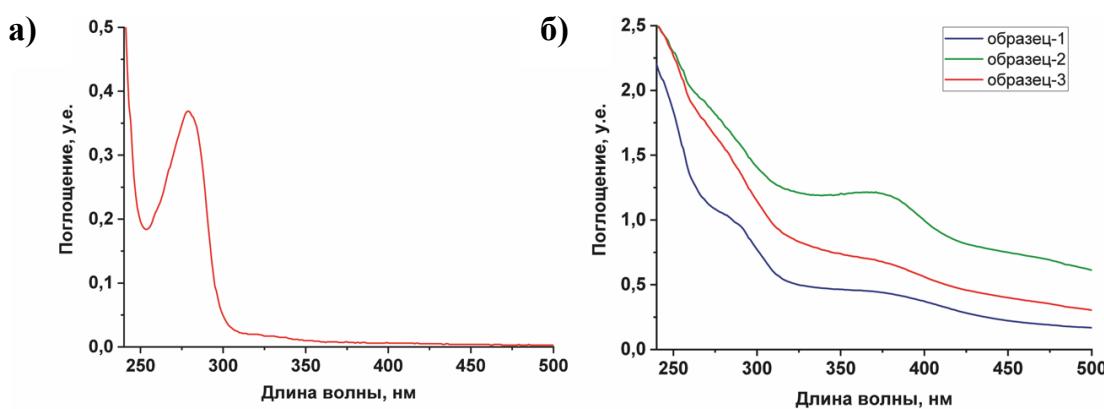
По результатам проведенного электрофореза можно сделать вывод о том, что в исследуемых образцах присутствуют низкомолекулярные 2S альбумины (10-20 кДа) и диссоциированные 11S глобулины с молекулярной массой 30-50 кДа.

Сложный состав белка подсолнечного шрота вызывает трудности при его выделении из исходного сырья. Особенno важно в процессе экстракции сохранить альбумины, так как они обладают наибольшей питательной ценностью. Кроме того, при анализе растительных объектов, которые содержат разные белки как по природе, так и молекулярной массе, а также характеризуются сложным составом матрицы, возникают сложности определения с помощью спектрофотометрических методов, так как они широко применимы только для определения индивидуальной формы белка.

## *Прямой спектрофотометрический метод*

Данный подход имеет преимущество среди других спектрофотометрических методов, так как не требует приготовления и использования дополнительных реагентов. Он основан на способности некоторых ароматических кислот белка (триптофана и тирозина) поглощать УФ свет при 280 нм.

Однако известно, что белки отличаются по содержанию ароматических аминокислот, в связи с чем их поглощение в УФ-области спектра может сильно различаться. В связи с этим, для установления возможности определения белка данным методом сравнили УФ-спектры поглощения растворов стандартного образца белка – бычьего сывороточного альбумина (БСА) – и трех коммерческих образцов белка подсолнечника (**рисунок 31**).

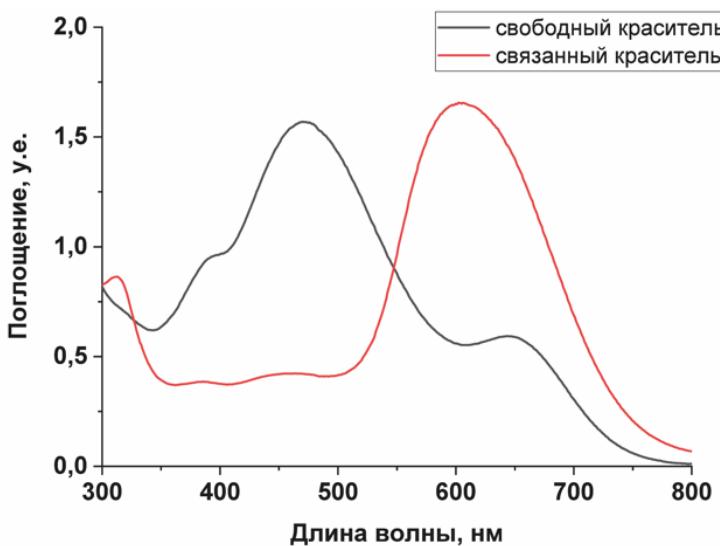


**Рисунок 31.** УФ-спектры поглощения а) БСА, б) трех коммерческих образцов подсолнечного белка.

У всех трех исследуемых образцов белка не наблюдается пика в области 280 нм, что может быть связано с различным аминокислотным составом БСА и белка подсолнечника, а также присутствием в исследуемых образцах мешающих матричных компонентов, например хлорогеновой кислоты с максимумом поглощения в области 330 нм. Таким образом, прямое спектрофотометрическое определение белка подсолнечника оказалось невозможным.

## *Метод Брэдфорда*

При добавлении к раствору белка красителя кумасси он связывается с протеином, что приводит к изменению окраски раствора с красновато-коричневой на синий. При этом после связывания с белком пик поглощения раствора красителя сдвигается от 465 до 595 нм, что продемонстрировано на **рисунке 32**.



**Рисунок 32.** Спектры поглощения свободного и связанного красителя кумасси.

Для построения градуировочной зависимости (рисунок 33) регистрировали спектры поглощения смеси стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций от 10 до 50 мкг/мл с красителем кумасси. По полученным результатам строили зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе. В таблице 14 приведены концентрации стандартных растворов БСА, результаты трехкратного определения поглощения смесей БСА с красителем кумасси, а также расчеты стандартных отклонений и доверительных интервалов.

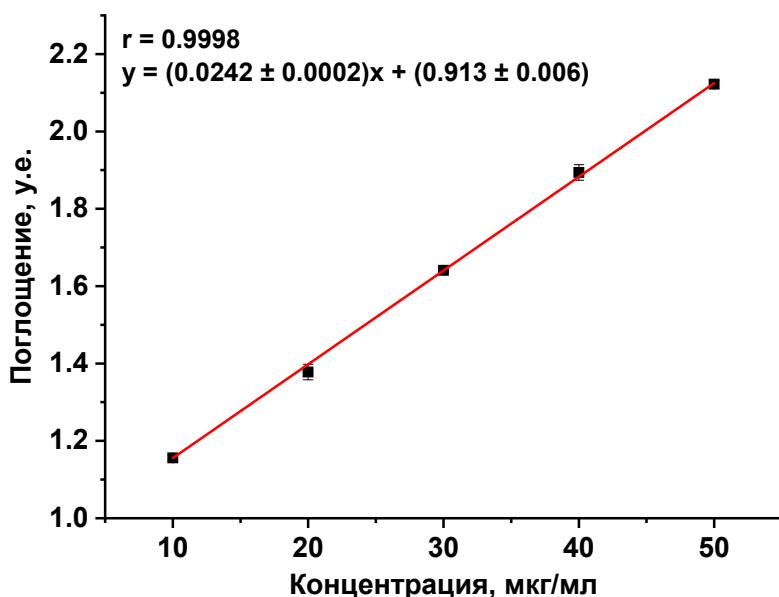
**Таблица 14.** Данные для построения градуировочной зависимости для определения белка с использованием метода Брэдфорда

Содержание БСА в стандартном растворе, мкг/мл	№ раствора	Поглощение, усл. ед.	Ср. значение поглощения, усл. ед.	$s_r$	$\Delta X$
10	1	1.16	1.16	0.002	0.007
	2	1.15			
	3	1.16			
20	1	1.37	1.38	0.004	0.02
	2	1.38			
	3	1.38			
30	1	1.64	1.64	0.001	0.004
	2	1.64			
	3	1.64			

40	1	1.89	1.89	0.004	0.02
	2	1.90			
	3	1.89			
50	1	2.12	2.12	0.003	0.01
	2	2.12			
	3	2.12			

\* $S_r$  – стандартное отклонение,  $\Delta X$  – доверительный интервал.

На основании полученных данных построили градуировочную зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе (**рисунок 33**).



**Рисунок 33.** Градуировочная зависимость для определения белка с использованием метода Брэдфорда.

Регистрировали спектры поглощения растворов лабораторного образца белка и трех коммерческих образцов с красителем кумасси. Исследуемые растворы готовили с ожидаемыми концентрациями белка 20, 30 и 40 мкг/мл, каждое определение повторяли трехкратно. Фактическое содержание белка в исследуемых растворах рассчитывали по уравнению градуировочного графика. Результаты определения приведены в **таблице 15**.

**Таблица 15.** Результаты определения белка по методу Брэдфорда ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Исследуемый образец белка	Ожидаемое содержание белка, мкг/мл	Фактическое содержание белка	
		мкг/мл	%
Лабораторный образец	20	8	38 ± 1
	30	12	
	40	15	
Коммерческий образец-1 (90%)	20	13	63 ± 1
	30	19	
	40	25	
Коммерческий образец-2 (82.5%)	20	9	44 ± 1
	30	13	
	40	17	
Коммерческий образец-3 (78%)	20	12	59 ± 1
	30	18	
	40	23	

Как оказалось, при определении белка методом Брэдфорда используемый в качестве белкового стандарта БСА обладает чрезмерным ответом на связывание с красителем кумасси и, таким образом, недооценивает содержание белка во всех исследуемых образцах, что делает данный метод непригодным для рутинного анализа белков подсолнечного шрота.

### ***Метод Бенедикта***

При добавлении к раствору БСА реактива Бенедикта в щелочной среде из-за взаимодействия пептидных связей с ионами меди (II) образуется окраска от голубой до фиолетовой в зависимости от концентрации БСА.

Для построения градуировочной зависимости регистрировали спектры поглощения смеси стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций от 200 до 1000 мкг/мл с реагентом Бенедикта. По полученным результатам строили зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе. В **таблице 16** приведены концентрации стандартных растворов БСА, результаты трехкратного

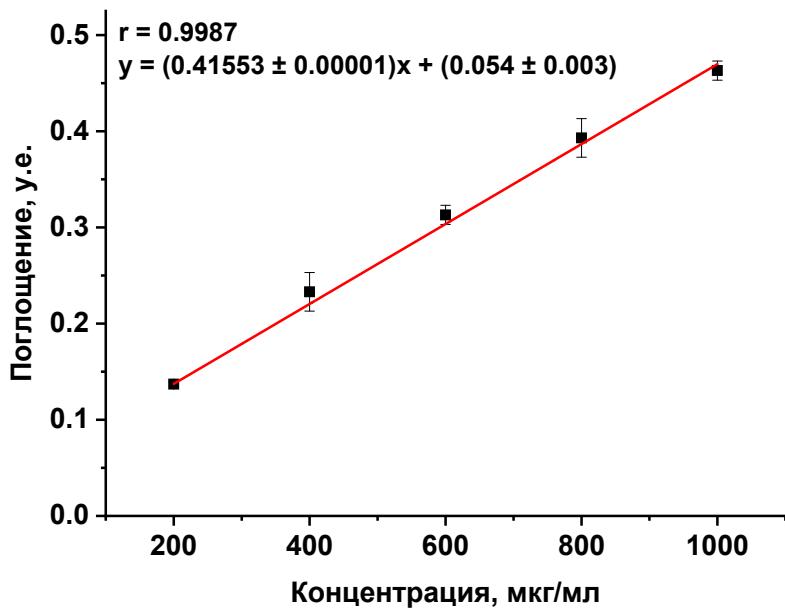
определения поглощения смесей БСА с реагентом Бенедикта, а также расчеты стандартных отклонений и доверительных интервалов.

**Таблица 16.** Данные для построения градуировочной зависимости для определения белка с использованием метода Бенедикта

Содержание БСА в стандартном растворе, мкг/мл	№ раствора	Поглощение, усл. ед.	Ср. значение поглощения, усл. ед.	$s_r$	$\Delta X$
200	1	0.13	0.14	0.008	0.02
	2	0.15			
	3	0.14			
400	1	0.26	0.23	0.02	0.05
	2	0.22			
	3	0.22			
600	1	0.31	0.31	0.007	0.02
	2	0.31			
	3	0.32			
800	1	0.42	0.39	0.03	0.07
	2	0.37			
	3	0.39			
1000	1	0.46	0.46	0.008	0.02
	2	0.46			
	3	0.45			

\* $S_r$  – стандартное отклонение,  $\Delta X$  – доверительный интервал.

На основании полученных данных построили градуировочную зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе (**рисунок 34**).



**Рисунок 34.** Градуировочная зависимость для определения белка с использованием метода Бенедикта.

Регистрировали спектры поглощения растворов лабораторного образца и трех коммерческих образцов с реагентом Бенедикта с ожидаемыми концентрациями белка 400, 600 и 800 мкг/мл, каждое определение повторяли трехкратно. Фактическое содержание белка в исследуемых образцах рассчитывали по уравнению градуировочного графика. Результаты определения приведены в таблице 17.

**Таблица 17.** Результаты определения белка по методу Бенедикта ( $n=3, P=0.95$ )

Исследуемый образец белка	Ожидаемое содержание белка, мкг/мл	Фактическое содержание белка	
		мкг/мл	%
Лабораторный образец	400	222	$55 \pm 1$
	600	332	
	800	443	
Коммерческий образец-1 (90%)	400	364	$91 \pm 1$
	600	547	
	800	729	
Коммерческий образец-2 (82.5%)	400	218	$54 \pm 1$
	600	327	
	800	463	

Коммерческий образец-3 (78%)	400	249	$62 \pm 1$
	600	373	
	800	497	

Содержание белка в лабораторном образце, определенное с помощью метода Бенедикта, составило  $(55 \pm 1)\%$ . Также получены заниженные результаты для всех трех коммерческих образцов по сравнению с заявленными производителями, что можно объяснить взаимодействием сопутствующих компонентов белковой матрицы с ионами меди или влиянием восстановливающих веществ.

#### ***Метод БЦК (с бицинхониновой кислотой)***

Для построения градуировочной зависимости регистрировали спектры поглощения смеси стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций от 20 до 100 мкг/мл с рабочим раствором, приготовленным согласно методике из п.5.3.3. По полученным результатам строили зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе. В **таблице 18** приведены концентрации стандартных растворов БСА, результаты трехкратного определения поглощения смесей БСА с рабочим раствором, расчеты стандартных отклонений и доверительных интервалов.

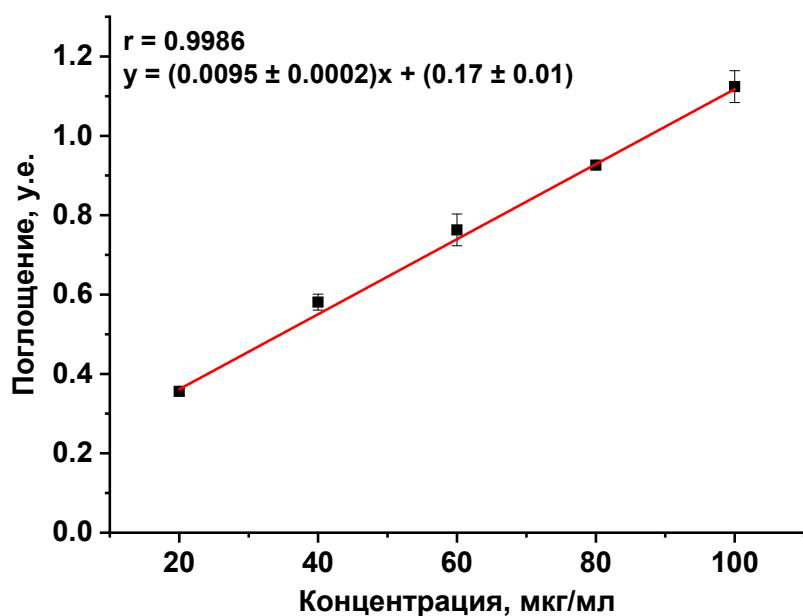
**Таблица 18.** Данные для построения градуировочной зависимости для определения белка с использованием метода с БЦК

Содержание БСА в стандартном растворе, мкг/мл	№ раствора	Поглощение, усл. ед.	Ср. значение поглощения, усл. ед.	$s_r$	$\Delta X$
20	1	0.36	0.36	0.005	0.01
	2	0.35			
	3	0.35			
40	1	0.59	0.58	0.009	0.02
	2	0.57			
	3	0.59			
60	1	0.76	0.76	0.02	0.04
	2	0.75			
	3	0.78			

80	1	0.92	0.93	0.003	0.008
	2	0.93			
	3	0.93			
100	1	1.11	1.12	0.02	0.04
	2	1.14			
	3	1.13			

\* $S_r$  – стандартное отклонение,  $\Delta X$  – доверительный интервал.

На основании полученных данных построили градуировочную зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе (**рисунок 35**).



**Рисунок 35.** Градуировочная зависимость для определения белка с использованием метода с БЦК.

Регистрировали спектры поглощения растворов лабораторного образца и трех коммерческих образцов с реагентом БЦК с ожидаемыми концентрациями белка 40, 60 и 80 мкг/мл, каждое определение повторяли трехкратно. Фактическое содержание белка в исследуемых образцах рассчитывали по уравнению градуировочного графика. Результаты определения приведены в **таблице 19**.

**Таблица 19.** Результаты определения белка по методу с БЦК ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Исследуемый образец белка	Ожидаемое содержание белка, мкг/мл	Фактическое содержание белка	
		мкг/мл	%
Лабораторный образец	40	19	$49 \pm 1$
	60	30	
	80	40	
Коммерческий образец-1 (90%)	40	35	$88 \pm 1$
	60	52	
	80	71	
Коммерческий образец-2 (82.5%)	40	29	$73 \pm 1$
	60	42	
	80	60	
Коммерческий образец-3 (78%)	40	25	$63 \pm 1$
	60	38	
	80	50	

Содержание белка в лабораторном образце, определенное с помощью метода БЦК, составило  $(49 \pm 1) \%$ . Аналогично результатам, полученным с помощью метода Бенедикта, получены заниженные результаты для всех трех коммерческих образцов белка по сравнению с заявленными производителями, что можно объяснить взаимодействием сопутствующих компонентов белковой матрицы с ионами меди или влиянием восстанавливающих веществ.

### *Метод Лоури*

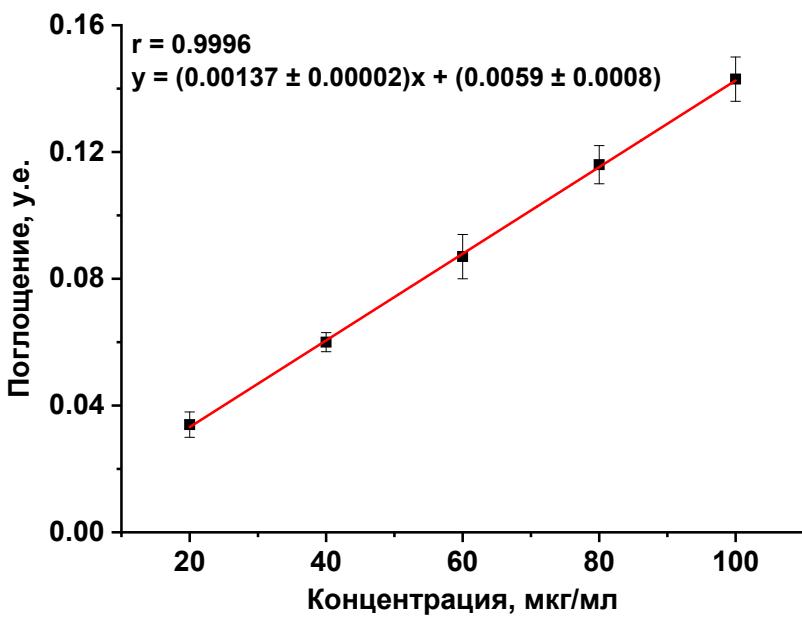
Для построения градиуровочной зависимости регистрировали спектры поглощения смеси стандартных растворов БСА в диапазоне концентраций от 20 до 100 мкг/мл с рабочим раствором, приготовленным согласно методике из Главы 5, п.5.3.3. По полученным результатам строили зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе. В **таблице 20** приведены концентрации стандартных растворов БСА, результаты трехкратного определения поглощения смесей БСА с рабочим раствором, а также расчеты стандартных отклонений и доверительных интервалов.

**Таблица 20.** Данные для построения градуировочной зависимости для определения белка с использованием метода Лоури

Содержание БСА в стандартном растворе, мкг/мл	№ раствора	Поглощение, усл. ед.	Ср. значение поглощения, усл. ед.	$s_r$	$\Delta X$
20	1	0.03	0.03	0.004	0.01
	2	0.03			
	3	0.04			
40	1	0.06	0.06	0.003	0.008
	2	0.06			
	3	0.06			
60	1	0.08	0.09	0.007	0.02
	2	0.10			
	3	0.08			
80	1	0.12	0.12	0.006	0.02
	2	0.12			
	3	0.11			
100	1	0.14	0.15	0.007	0.02
	2	0.15			
	3	0.15			

\* $S_r$  – стандартное отклонение,  $\Delta X$  – доверительный интервал.

На основании полученных данных построили градуировочную зависимость поглощения от концентрации БСА в стандартном растворе (**рисунок 36**).



**Рисунок 36.** Градуировочная зависимость градуировочной зависимости для определения белка с использованием метода Лоури.

Регистрировали спектры поглощения растворов лабораторного образца и трех коммерческих образцов с рабочим раствором с ожидаемыми концентрациями белка 40, 60 и 80 мкг/мл, каждое определение повторяли трехкратно. Фактическое содержание белка в исследуемых образцах рассчитывали по уравнению градуировочного графика. Результаты определения приведены в **таблице 21**.

**Таблица 21.** Результаты определения белка по методу Лоури ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Исследуемый образец белка	Ожидаемое содержание белка, мкг/мл	Фактическое содержание белка	
		мкг/мл	%
Лабораторный образец	40	22	$55 \pm 1$
	60	33	
	80	44	
Коммерческий образец-1 (90%)	40	89	$89 \pm 1$
	60	90	
	80	89	
Коммерческий образец-2 (82.5%)	40	22	$54 \pm 1$
	60	33	
	80	42	

Коммерческий образец-3 (78%)	40	30	77 ± 1
	60	46	
	80	62	

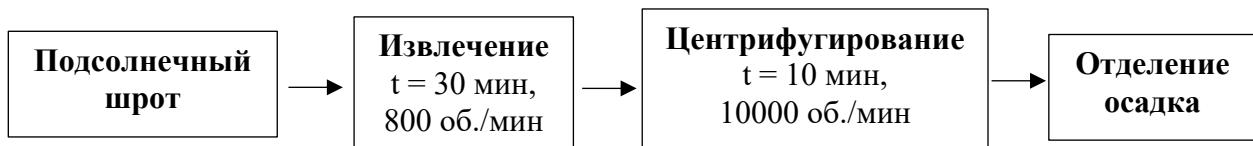
Содержание белка в лабораторном образце, определенное с помощью метода Лоури, составило  $(55 \pm 0.1)\%$ . При определении белка методом Лоури в диапазоне 20-100 мкг/мл получены результаты, соответствующие заявленным (для образца-1 и образца-3). Достаточно высокая чувствительность (предел обнаружения 9.7 мкг/мл) данного метода позволяет исключить мешающие влияние компонентов матрицы (полисахаридов и фенольных соединений).

Таким образом, установлено, что для определения общего количества белка наиболее подходящим является использование азотометрического метода Дюма в тандеме со спектрофотометрическим методом Лоури, в основе которого лежит реакция на пептидные связи.

## 7.2 Методы определения фенольных соединений

### 7.2.1 Спектрофотометрические методы

Методы Фолина-Чокальтеу и Берлинской лазури применяли для выбора оптимальных условий выделения фенольных соединений из подсолнечного шрота. Краткая блок-схема получения фенольных экстрактов представлена на Рисунке 37.



**Рисунок 37.** Блок-схема получения фенольных экстрактов из подсолнечного шрота.

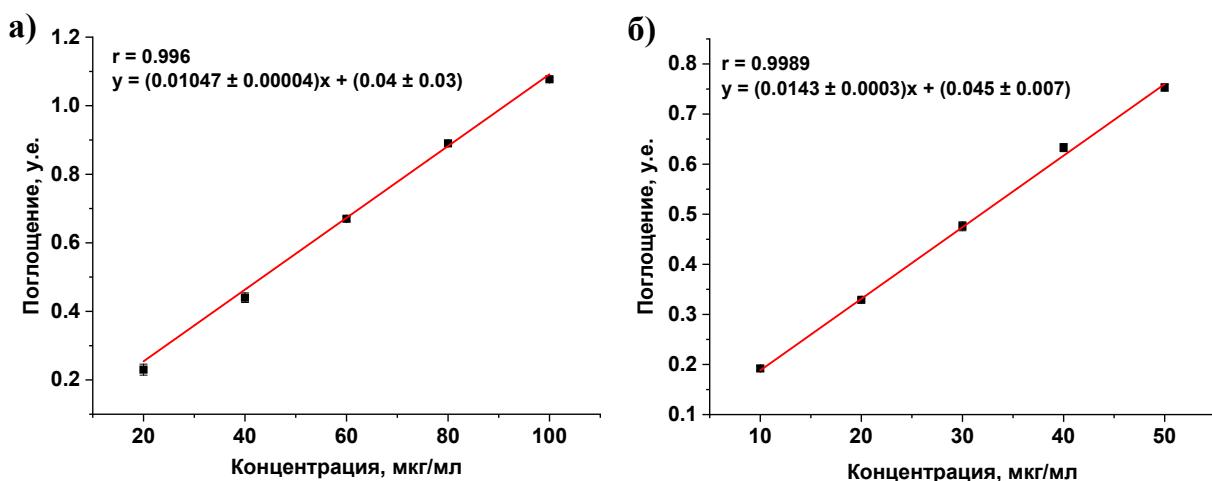
Навеску подсолнечного шрота помещали в пластиковую пробирку вместимостью 50 мл, растворяли в соответствующем растворителе (гидромодуль 1:30). В качестве растворителя использовали воду, 20% этанол, 50% этанол и 80% этанол. Извлечение фенольных соединений проводили с помощью виброшнейкера при скорости 800 об/мин в течение 5, 15 и 30 минут. Затем растворы центрифugировали при 10000 об./мин в течение 10 минут. Осадок отделяли, а надосадочную жидкость – фенольный экстракт – использовали для дальнейших исследований.

**Результаты определения общего содержания фенольных соединений в подсолнечном шроте и получаемом белковом препарате методами Фолина-Чокальтеу и Берлинской лазури**

Для построения градуировочной зависимости с использованием метода Фолина-Чокальтеу готовили серию стандартных растворов хлорогеновой кислоты в диапазоне концентраций от 20 до 100 мкг/мл (**рисунок 38а**). Реакцию проводили в соответствии с методикой, описанной в Главе 5, п.5.3.5. Максимум поглощения регистрировали при длине волны 760 нм. Для подтверждения сходимости полученных результатов, каждое определение повторяли 3 раза.

Аналогично, для построения градуировочной зависимости при использовании метода Берлинской лазури готовили серию стандартных растворов хлорогеновой кислоты в диапазоне концентраций от 10 до 50 мкг/мл (**рисунок 38б**). Реакцию проводили в соответствии с методикой, описанной в Главе 5, п. 5.3.5. Максимум поглощения регистрировали при длине волны 720 нм. Для подтверждения сходимости полученных результатов, каждое определение повторяли 3 раза.

Результаты, полученные с помощью двух методов для 12 образцов фенольных экстрактов подсолнечного шрота, представлены в **таблице 22**.



**Рисунок 38.** Градуировочная зависимость для определения фенольных соединений а) методом Фолина-Чокальтеу, б) методом Берлинской лазури.

**Таблица 22.** Результаты содержания фенольных соединений в экстрактах подсолнечного шрота, полученные с помощью методов Фолина-Чокальтеу (ФЧ) и Берлинской лазури (БЛ) ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

Условия экстракции	Время экстракции, мин					
	5 мин		15 мин		30 мин	
	ФЧ	БЛ	ФЧ	БЛ	ФЧ	БЛ
<b>Содержание фенольных соединений, %</b>						
H <sub>2</sub> O	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1	5.3 ± 0.1
20% этанол	4.5 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	5.1 ± 0.1
50% этанол	4.1 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	4.8 ± 0.1	5.5 ± 0.1
80% этанол	2.7 ± 0.1	3.5 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1	4.4 ± 0.1

По полученным данным можно сделать вывод, что с увеличением времени извлечения растет содержание фенольных соединений в образцах, а также, что наиболее эффективным растворителем является 50% этанол.

### 7.2.2 Определение фенольных соединений методом ВЭЖХ

По результатам анализа литературных данных, связанных с анализом фенольных кислот, выбрали обращено-фазовый вариант ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием, что должно обеспечить хорошую разрешающую способность и высокую точность результатов определения.

Основным параметром при спектрофотометрическом детектировании соединений является длина волны поглощения. Для достижения наибольшей чувствительности целесообразно выбрать длину волны, при которой наблюдается максимум поглощения определяемого соединения. Для детектирования хлорогеновой, кофейной и хинной кислот оптимальным является использование 210 нм, 320 нм и 330 нм, так как эти длины волн соответствуют максимумам поглощения исследуемых фенольных кислот.

Природа неподвижной (НФ) и подвижной (ПФ) фаз оказывают влияние на удерживание компонентов и селективность их разделения. Для анализа выбрали хроматографическую колонку Synergi<sup>TM</sup> Hydro-RP 80 (250 x 4.6 мм, 4 мм), так как ее НФ помимо неполярного сорбента включает в себя вкрапления полярных модификаторов, что способно обеспечить хорошее разделение органических кислот.

В качестве подвижной фазы использовали различные соотношения 0.1% раствора фосфорной кислоты (подвижная фаза А) и ацетонитрила (подвижная фаза В). Добавку фосфорной кислоты использовали для перевода анализов в протонированную форму с целью увеличения времени удерживания соединений. Хроматографические условия разделения хлорогеновой, кофейной и хинной кислот при их совместном присутствии в модельном растворе представлены в **таблице 23**.

**Таблица 23.** Хроматографические условия определения фенольных соединений

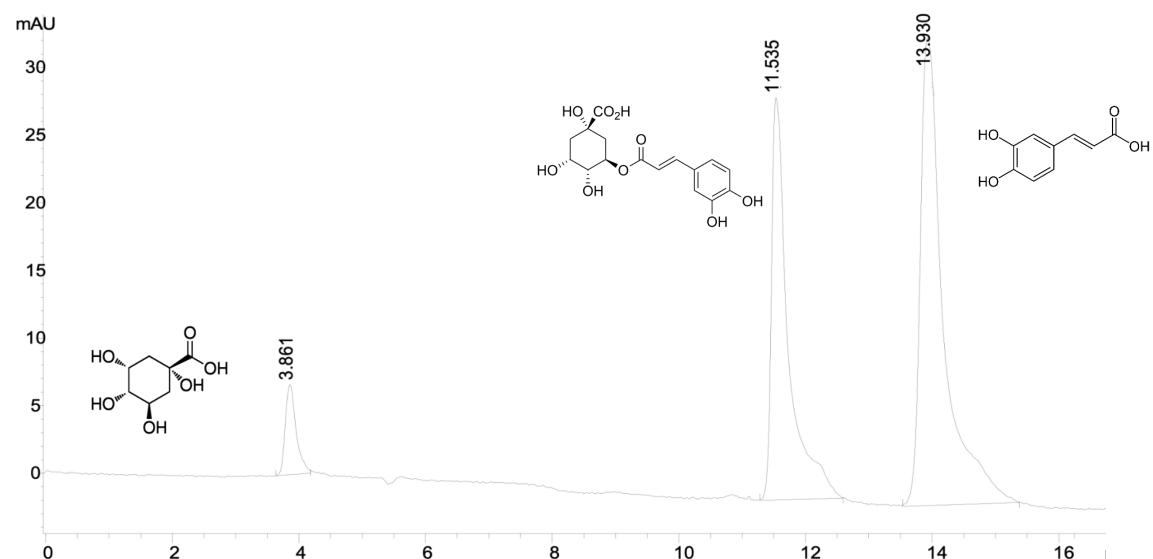
<b>Колонка</b>	хроматографическая колонка Synergi Hydro-RP, 250 × 4,6 мм, с размером частиц 4 мкм
<b>Температура колонки</b>	30°С
<b>Скорость потока</b>	0.7 мл/мин
<b>Детектор</b>	УФ, 210 и 330 нм
<b>Объем ввода</b>	50 мкл
<b>Время анализа</b>	около 17 минут

Из-за различия в удерживании исследуемых фенольных кислот, был сделан вывод о необходимости использования градиентного режима элюирования (**таблица 24**).

**Таблица 24.** Программа градиента подвижных фаз

<b>Время, мин</b>	<b>Подвижная фаза А, % (0.1% раствор H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	<b>Подвижная фаза В, % (CH<sub>3</sub>CN)</b>
0 – 2	95	5
2 – 6	95 → 80	5 → 20
6 – 17	80	20

В предложенных хроматографических условиях с использованием градиентного режима элюирования достигли разделения трех основных фенольных соединений подсолнечного шрота при их совместном присутствии в стандартном растворе (**рисунок 39**).



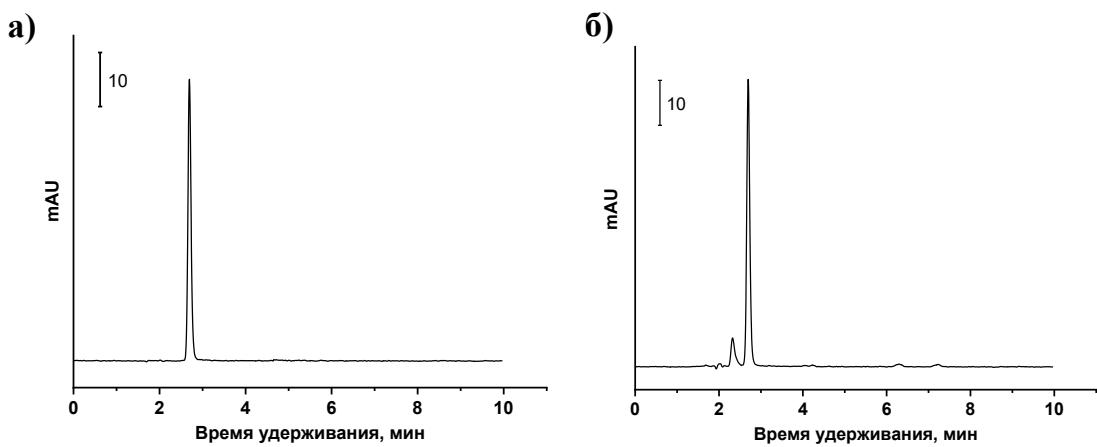
**Рисунок 39.** Хроматограмма модельного раствора трех фенольных кислот: хлорогеновой, кофейной и хинной (концентрация 0.4 мкг/мл).

Однако при переходе к реальному объекту – экстракту подсолнечного шрота выяснилось, что единственным фенольным соединением в нем является хлорогеновая кислота. С целью сокращения времени анализа выбрали соотношение фаз 0.1% раствора фосфорной кислоты и ацетонитрила – 80 : 20, оставили одну длину волны детектирования – 330 нм (максимум поглощения хлорогеновой кислоты) и увеличили скорость потока до 1 мл/мин. Хроматографические условия для определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте представлены в таблице 25.

**Таблица 25.** Хроматографические условия определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте

<b>Колонка</b>	хроматографическая колонка Syngi Hydro-RP, 250 × 4,6 мм, с размером частиц 4 мкм
<b>Температура колонки</b>	30°С
<b>Скорость потока</b>	1 мл/мин
<b>Детектор</b>	УФ, 330 нм
<b>Объем ввода</b>	50 мкл
<b>Время анализа</b>	около 10 минут

На хроматограммах (**рисунок 40**) расположение пика раствора стандартного образца соответствуют расположению пика исследуемого раствора, время удерживания хлорогеновой кислоты составляет около 2.5 минут.



**Рисунок 40.** Хроматограммы а) стандартного образца хлорогеновой кислоты (концентрация 2 мкг/мл), б) экстракта подсолнечного шрота (50% этанол, 30 мин).

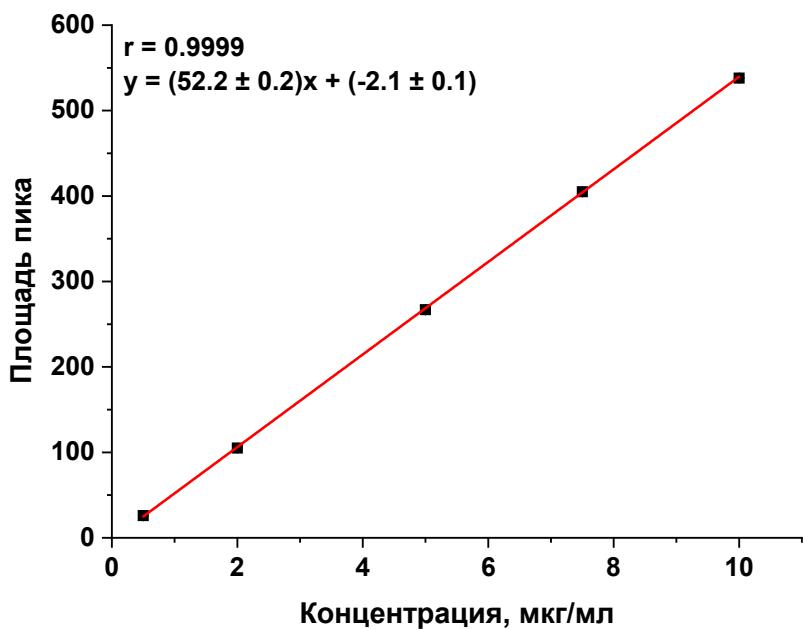
В выбранных хроматографических условиях определяли содержание хлорогеновой кислоты в экстрактах, полученных в разных условиях, а также в лабораторном образце белка. Для этого хроматографировали стандартные растворы хлорогеновой кислоты в диапазоне концентраций от 0.5 до 10 мкг/мл и строили зависимость площади пика от концентрации хлорогеновой кислоты в стандартном растворе. В **таблице 26** приведены концентрации стандартных растворов хлорогеновой кислоты, результаты трехкратного определения площадей пиков, а также расчеты стандартных отклонений и доверительных интервалов.

**Таблица 26.** Данные для построения градуировочной зависимости определения хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ

Содержание ХГК в стандартном растворе, мкг/мл	Ср. значение площади пика	$s_r$	$\Delta X$
0.5	26	0.05	0.1
2.0	105	0.04	0.1
5.0	267	0.09	0.2
7.5	405	0.05	0.1
10.0	538	0.15	0.3

\* $s_r$  – стандартное отклонение,  $\Delta X$  – доверительный интервал.

На основании полученных данных построили градуировочную зависимость площади пика хлорогеновой кислоты от ее концентрации в стандартном растворе (**рисунок 41**) и рассчитали предел обнаружения, который составил 0.01 мкг/мл.



**Рисунок 41.** Градуировочная зависимость для определения хлорогеновой кислоты методом ВЭЖХ.

Хроматографировали испытуемые растворы фенольных экстрактов, предварительно разбавленных в 200 раз. Содержание хлорогеновой кислоты определяли по уравнению градуировочного графика. Результаты определения приведены в **таблице 27**.

**Таблица 27.** Результаты определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом ВЭЖХ с УФ-детектированием ( $n=3$ ,  $P=0.95$ )

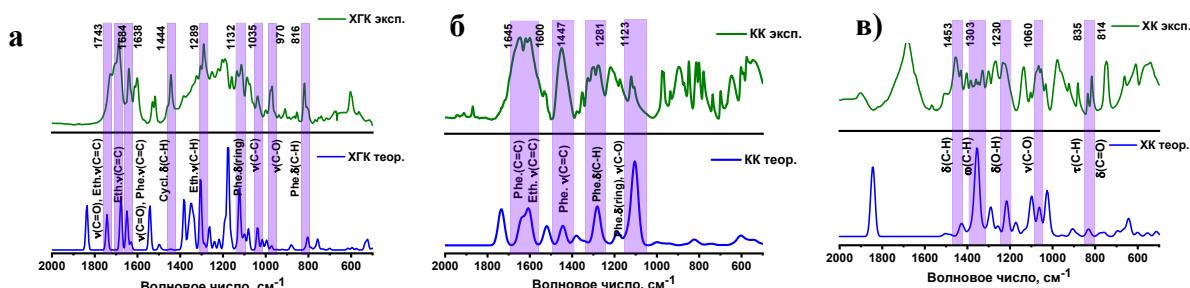
Условия извлечения	Время удерживания хлорогеновой кислоты, мин	Содержание хлорогеновой кислоты в образце, %
H <sub>2</sub> O, 30 мин	2.7	2.4 ± 0.1
20% этанол, 30 мин	2.7	3.3 ± 0.2
50% этанол, 30 мин	2.7	3.6 ± 0.2
80% этанол, 30 мин	2.7	3.1 ± 0.3

Для получения фенольных экстрактов из белкового препарата растворяли его точную навеску в гидроксиде калия с pH 11, центрифугировали при 10000 об./мин в течение 10 минут и удаляли нерастворимый осадок. Содержания хлорогеновой кислоты в образце лабораторного белка составило (0.03 ± 0.02) %, что почти в 100 раз меньше по сравнению с исходным растительным сырьем.

### 7.2.3 Определение фенольных соединений методом ИК-спектроскопии

#### *Сравнение теоретических и экспериментальных ИК-спектров фенольных кислот*

ИК-спектры хлорогеновой, кофейной и хинной кислот получили экспериментально и рассчитали с помощью метода DFT (теория функционала плотности) с коэффициентом масштабирования 1.0000 (рисунок 42). Основные полосы поглощения в средней ИК-области ( $2000\text{-}500\text{ см}^{-1}$ ) хорошо согласуются в экспериментальных и модельных спектрах, при этом существуют расхождения в относительных интенсивностях. Колебания, соответствующие характеристическим полосам, описаны в таблице 28.



**Рисунок 42.** Теоретические и экспериментальные ИК-спектры а) хлорогеновой кислоты, б) кофейной кислоты, в) хинной кислоты.

**Таблица 28.** Сопоставление теоретических и экспериментальных колебаний хлорогеновой, хинной и кофейной кислот

Волновое число, см <sup>-1</sup> теоретическое	Волновое число, см <sup>-1</sup> экспериментальное	Колебания
<b>Хлорогеновая кислота</b>		
802	816	Phe. $\delta(\text{C-H})$ , Cycl. $\nu(\text{C-C})$ , $\delta(\text{O-H})$ в COOH
972	970	$\nu(\text{C-O})$ в COOH, Phe. $\nu(\text{C-O})$ , $\nu(\text{C-H})$ , Phe. $\omega(\text{C-H})$ , Phe. $\delta(\text{ring})$ , Cycl. $\delta(\text{ring})$
1035	1035	$\nu(\text{C-C})$ , Cycl. $\delta(\text{ring})$
1119	1111	Phe. $\delta(\text{ring})$ , Phe. $\nu(\text{C-O})$ , Phe. $\rho(\text{C-H})$
1304	1289	Eth. $\nu(\text{C-H})$ , Phe. $\nu(\text{C-C})$ , Phe. $\delta(\text{C-H})$
1444	1444	Cycl. $\delta(\text{C-H})$
1648	1638	Phe. $\nu(\text{C-C})$ , Phe. $\nu(\text{C=C})$ , Eth. $\nu(\text{C=C})$ , $\nu(\text{C=O})$ эфир

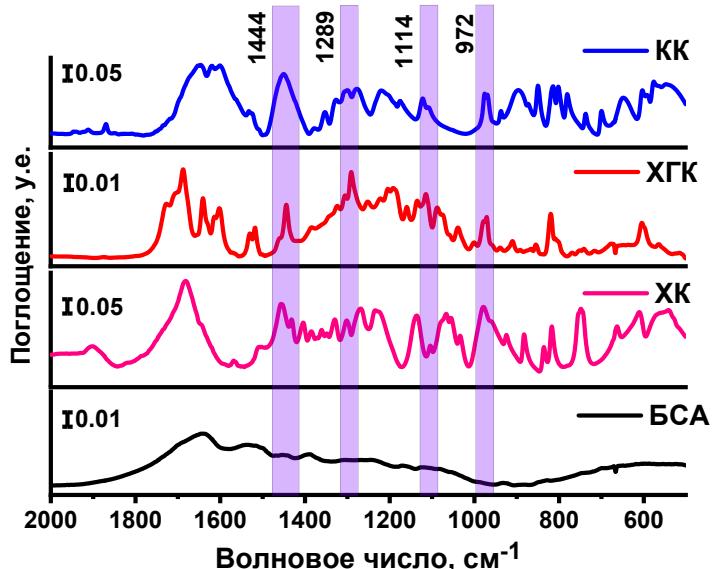
1679	1684	Phe. $\nu$ (C-C), Phe. $\nu$ (C=C), Eth. $\nu$ (C=C), Eth. $\delta$ (C-H), $\nu$ (C=O) эфир
1743	1743	Eth. $\nu$ (C=C), $\nu$ (C=O) эфир, Eth. $\delta$ (C-H)
<b>Кофеинная кислота</b>		
1129	1123	Phe. $\delta$ (rivg), Phe. $\nu$ (C-O)
1310	1310	Phe. $\delta$ (C-H), Phe. $\nu$ (C-O)
1410	1450	Phe. $\nu$ (C=C), $\delta$ (C-C), Phe. $\delta$ (O-H)
1475	1450	Phe. $\nu$ (C=C), Phe. $\nu$ (C-C), $\delta$ (C-C)
1643	1600	Phe. $\nu$ (C=C), Phe. $\nu$ (C-C), Eth. $\nu$ (C=C), $\nu$ (C-C), Phe. $\delta$ (C-H)
1675	1645	Phe. $\nu$ (C=C), Phe. $\nu$ (C-C), Eth. $\nu$ (C=C), $\nu$ (C-C), Phe. $\delta$ (C-H)
<b>Хинная кислота</b>		
832	814	$\nu$ (C-O) в COOH, $\delta$ (C=O), $\delta$ (C-H) в COOH
1025	1029	$\nu$ (C-C)
1060	1060	$\nu$ (C-O)
1100	1100	$\nu$ (C-O)
1215	1230	$\delta$ (O-H), $\rho$ (CH <sub>2</sub> )
1354	1354	$\rho$ (CH <sub>2</sub> )

\*Виды колебаний:  $\nu$  – валентное;  $\delta$  – деформационное ножничное;  $\omega$  – деформационное веерное;  $\tau$  – деформационное маятниковое,  $\rho$  – деформационное крутильное.

\*\*Сокращения: Phe. – фенильное ядро; Eth. – этилен; Cycl. – циклогексановая группа (хинная кислота).

### **Сравнение ИК-спектров фенольных кислот и БСА**

На первом этапе исследования изучили возможность одновременного определения хлорогеновой, кофеинной и хинной кислот с помощью ИК-спектроскопии. Критерием возможности проведения мультиплексного анализа является наличие индивидуальных характеристических полос для каждого соединения. Однако, как видно на **рисунке 43**, ИК-спектры исследуемых соединений демонстрируют значительное наложение друг на друга.



**Рисунок 43.** Сравнение ИК-спектров БСА, хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты и хинной кислоты.

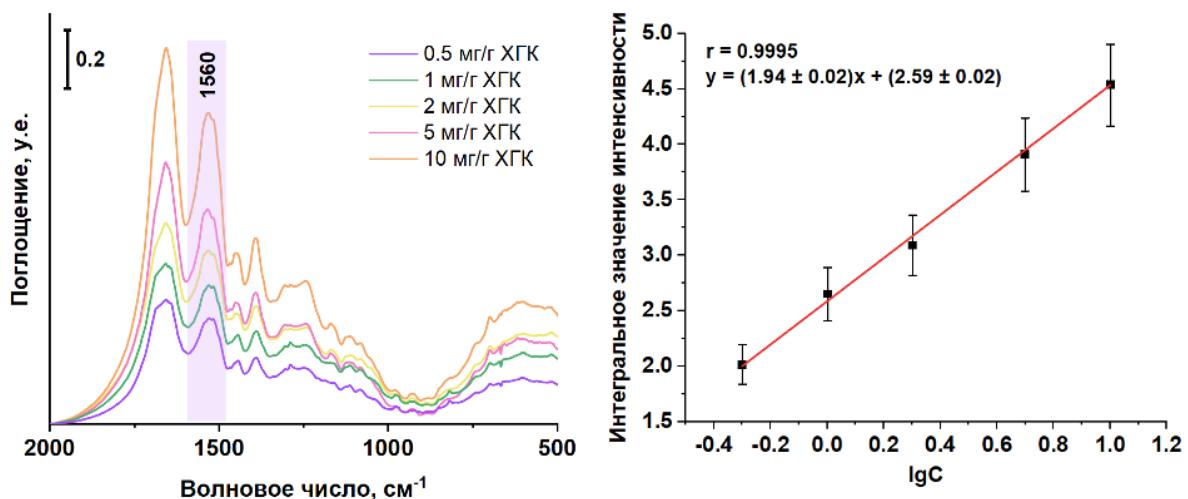
Поскольку хлорогеновая кислота представляет собой сложный эфир кофейной и хинной кислот, в ее ИК-спектр должна присутствовать характеристическая полоса, соответствующая колебаниям карбонильной группы ( $\text{C}=\text{O}$ ) сложноэфирной связи при  $1743 \text{ см}^{-1}$ . Однако в данной спектральной области ( $1630\text{-}1750 \text{ см}^{-1}$ ) наблюдали наложение полос, что приводит к плохому разрешению пиков. Кроме того, низкая интенсивность пика валентных колебаний карбонильной группы хлорогеновой кислоты (примерно в 5 раз ниже по сравнению с полосами кофейной и хинной кислот в той же спектральной области) делает невозможным одновременное определение этих соединений методом ИК-спектроскопии.

Так как именно продукты окисления хлорогеновой кислоты необратимо связываются с молекулами белков, придавая продукции на их основе нежелательное зеленое окрашивание, далее сосредоточились на разработке подходов к определению только этого соединения на фоне белковой матрицы и в растительном сырье. Как видно на **рисунке 43**, характеристические полосы БСА не расположены в области «отпечатков пальцев», поэтому модельный белок не мешает определению хлорогеновой кислоты.

#### *Определение хлорогеновой кислоты в матрице БСА*

На **рисунке 44** представлены ИК-спектры хлорогеновой кислоты в матрице БСА в диапазоне концентраций от 1 до 10 мг/г и соответствующая градуировочная зависимость рассчитанных интегральных значений поглощения (для

характеристической полосы в области  $1560 \text{ см}^{-1}$ ) от логарифма концентрации аналита в матрице БСА с коэффициентом корреляции 0.9995 (таблица 29).



**Рисунок 44.** ИК-спектры модельных смесей хлорогеновой кислоты в матрице БСА и соответствующая градуировочная зависимость.

**Таблица 29.** Метрологические характеристики методики определения хлорогеновой кислоты в матрице БСА методом ИК спектроскопии

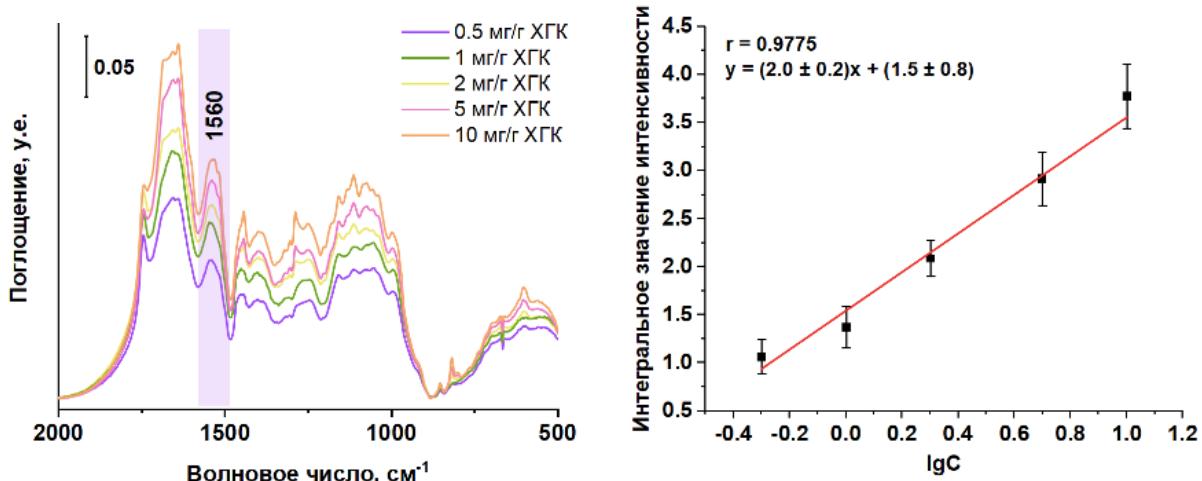
Определяемое вещество	Диапазон определяемых содержаний, мг/г	$C_{\min}, \text{мг/г}$	Коэф. корреляции, $r$	$s_r$ (при $C_{\text{ниж.}}, n=5, P=0.95$ )
Хлорогеновая кислота	0.5 – 10	0.2	0.9995	0.18

Предел обнаружения хлорогеновой кислоты составил 0.2 мг/г, что говорит о недостаточной чувствительности метода ИК-спектроскопии для анализа белковых изолятов.

#### *Определение хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом добавок*

На рисунке 45 представлены ИК-спектры подсолнечного шрота с добавленным содержанием хлорогеновой кислоты от 0.5 до 10 мг/г и соответствующая градуировочная зависимость рассчитанных интегральных значений поглощения (для характеристической полосы в области  $1560 \text{ см}^{-1}$ , соответствующей валентным колебаниям карбоксилат-иона) от логарифма

концентрации аналита в матрице подсолнечного шрота с коэффициентом корреляции 0.9775 (таблица 30).



**Рисунок 45.** ИК-спектры подсолнечного шрота с добавленным содержанием хлорогеновой кислоты и соответствующая градуировочная зависимость.

**Таблица 30.** Метрологические характеристики методики определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте методом ИК-спектроскопии.

Определяемое вещество	Диапазон определяемых содержаний, мг/г	$C_{\min},$ мг/г	Коэф. корреляции, $r$	$s_r$ (при $C_{\text{ниж.}}, n=5,$ $P=0.95$ )
Хлорогеновая кислота	0.5 – 10	0.2	0.9775	0.12

Таким образом, метод ИК-спектроскопии позволяет определять содержание хлорогеновой кислоты в исследуемом растительном объекте с пределом обнаружения  $2.7 \times 10^{-3}$  мг/г (в пересчете на таблетку KBr). Содержание хлорогеновой кислоты в образце подсолнечного шрота, определенное с помощью метода добавок, составило  $(5.6 \pm 0.8)$  мг/г.

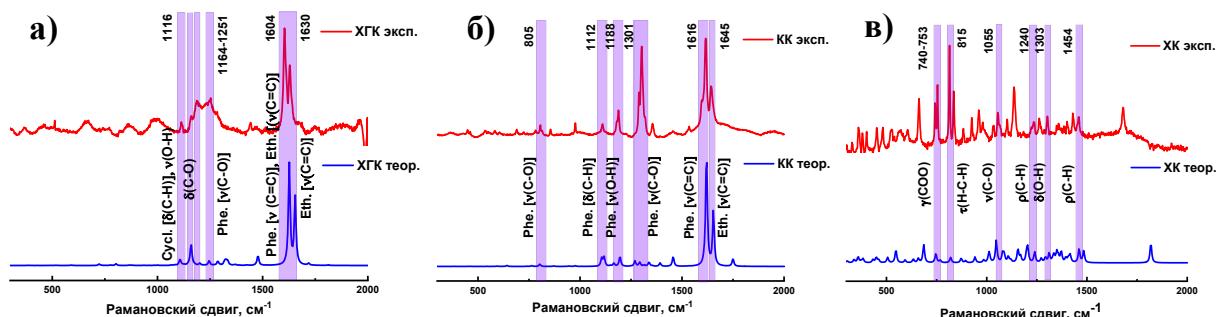
Несмотря на то, что методика для определения вышеуказанного фенольного соединения методом ИК-спектроскопии имеет более широкий доверительный интервал, чем спектрофотометрические методы и ВЭЖХ, полученные в ходе исследования данные подтверждают, что он является подходящим для оценки первичного растительного сырья на содержание хлорогеновой кислоты как основного фенольного соединения подсолнечного шрота. Основное преимущество разработанного подхода заключается в том, что он не требует предварительной

пробоподготовки (экстракции фенольных соединений из матрицы белка и подсолнечного шрота), так как изменение условий (растворитель, время, температура) может увеличить или сократить содержание фенольных соединений в экстракте с величиной отклонения друг от друга на порядок больше доверительного интервала для каждого образца (**таблица 29, 30**). Это делает аналитические характеристики сигнала, определяемого методом ИК-спектроскопии, близкими к характеристикам, получаемым методами спектрофотометрии и ВЭЖХ.

#### 7.2.4 Определение фенольных соединений методом спектроскопии комбинационного рассеяния (КР)

##### *Сравнение теоретических и экспериментальных КР-спектров фенольных кислот*

В связи с тем, что в научной литературе практически отсутствуют систематические данные по КР-спектрам хлорогеновой, кофейной и хинной кислот, на первом этапе работы провели сравнительный анализ экспериментальных спектров с теоретическими, рассчитанными методом DFT с коэффициентом масштабирования 0.9778 (**рисунок 46**). На основании этого сравнения интерпретировали типы колебаний, наблюдаемые в экспериментально полученных спектрах.



**Рисунок 46.** Теоретические и экспериментальные КР-спектры а) хлорогеновой кислоты, б) кофейной кислоты, в) хинной кислоты ( $\lambda=532$  нм).

Описание колебаний, соответствующих полосам комбинационного рассеяния представлено в **таблице 31**. Анализ полученных данных демонстрирует общее соответствие набора характеристических колебаний в модельных и экспериментальных КР-спектрах, хотя для некоторых из них отмечаются различия в положениях максимумов и их относительной интенсивности.

**Таблица 31.** Сопоставление экспериментальных и расчетных КР-сдвигов хлорогеновой, кофейной и хинной кислот

Рамановский сдвиг, см <sup>-1</sup>	Рамановский сдвиг, см <sup>-1</sup>	Колебания
Теоретические данные	Экспериментальные данные	
<b>Хлорогеновая кислота</b>		
1107	1116	v(O-H), Phe. δ(ring), Phe. δ(C-H), Cycl. δ(ring)
1160	1160	δ(C-O), Eth. δ(C-H), δ(C-H)
1197	1197	Phe. δ(C-H), Phe. δ(O-H)
1246	1246	Phe. δ(C-H), Eth. δ(C-H), Phe. v(C-O)
1627	1604	Phe. v(C=C), Phe. δ(O-H), Eth. v(C=C)
1655	1630	Eth. v(C=C), Phe. v(C=C), v(C=O) эфир
<b>Кофеинная кислота</b>		
804	805	Phe. δ(ring), Phe. v(C-O)
975	975	Phe. δ(ring),, Phe. δ(C-H), Eth. δ(C-H).
1109	1109	Phe. δ(ring), Phe. δ(O-H), Eth. δ(C-H)
1116	1112	Phe. δ(ring), v(C-O) в -COOH, Eth. δ(C-H)
1196	1188	Phe. v(O-H), Phe. δ(C-H), Eth. δ(C-H)
1268	1268	δ(O-H) в COOH - группе, Phe. δ(C-H), Phe. ρ(C-H)
1294	1301	Phe. v(C-O), Phe. δ(C-H)
1619	1616	Phe. v(C=C), Eth. v(C=C)
1655	1645	Eth. v(C=C), Phe. v(C=C)
<b>Хинная кислота</b>		
685	685	δ(COO)
748	748	δ(COO)
822	815	τ(CH <sub>2</sub> )
1044	1055	v(C-O), δ(O-H)

1136	1158	$\nu(\text{C-O})$ , $\delta(\text{O-H})$
1240	1240	$\delta(\text{O-H})$ , $\delta(\text{C-H})$ , $\rho(\text{CH}_2)$
1310	1303	$\delta(\text{O-H})$ , $\delta(\text{C-H})$ , $\rho(\text{CH}_2)$
1460	1454	$\rho(\text{CH}_2)$
2960	2932	$\nu(\text{C-H})$ , $\delta(\text{CH}_2)$
3004	2975	$\nu(\text{C-H})$ , $\delta(\text{CH}_2)$

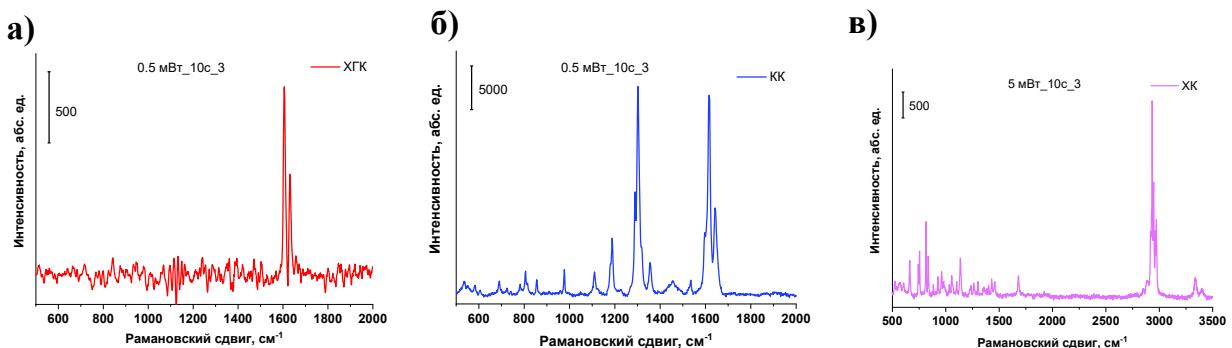
\*Виды колебаний:  $\nu$  – валентное;  $\delta$  – деформационное ножничное;  $\omega$  – деформационное веерное;  $\tau$  – деформационное маятниковое,  $\rho$  – деформационное крутильное.

\*\*Сокращения: *Phe.* – фенильное ядро; *Eth.* – этилен; *Cycl.* – циклогексановая группа (хинная кислота).

### **Регистрация КР-спектров фенольных кислот**

Регистрация КР-спектров фенольных кислот при возбуждении лазером с длиной волны 514 нм при низкой мощности (~0.1 мВт) выявила чрезвычайно высокую КР-активность кофейной кислоты, так как при ее исследовании наблюдали высокие фоновый и аналитический сигналы. В результате этого на фоне ее спектра невозможно различить характеристические пики хлорогеновой и хинной кислот. Повышение мощности лазера примерно на порядок (до 5 мВт) позволило зарегистрировать характеристические полосы хлорогеновой и хинной кислот. Однако из-за ограничения детектора лазер с длиной волны 514 нм оказался неприменим для анализа исследуемых фенольных соединений.

Использование лазера с длиной волны 532 нм (**рисунок 47**) позволило зарегистрировать КР-спектры всех трех фенольных кислот, однако только при использовании разного диапазона мощностей лазерного излучения: хлорогеновой кислоты – при средних мощностях (~0.5 мВт), кофейной кислоты – при низких (0.05–0.5 мВт), а для детектирования сигнала хинной кислоты потребовалась мощность не менее 5 мВт. Оптимальные условия регистрации сигнала: время накопления сигнала 10 секунд, количество накоплений – 3.



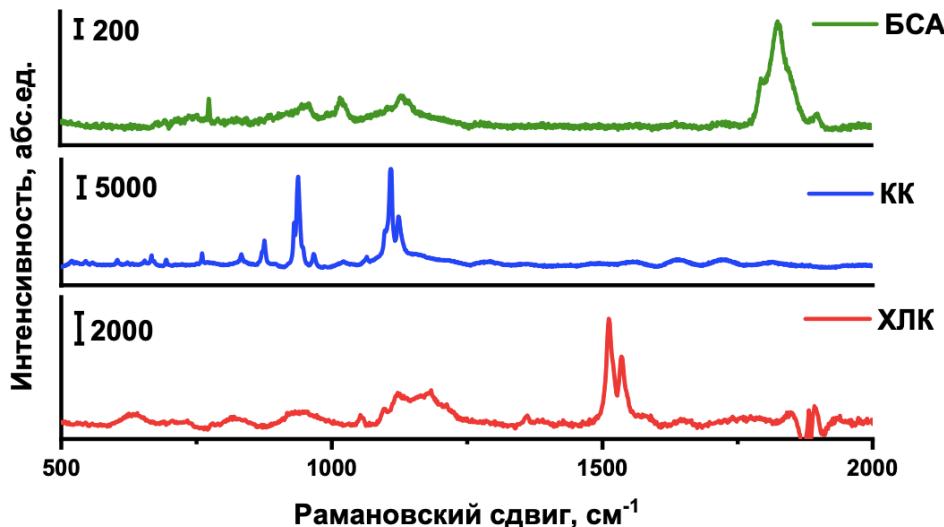
**Рисунок 47.** КР-спектры а) хлорогеновой кислоты, б) кофейной кислоты, в) хинной кислоты.

При использовании лазера с длиной волны 785 нм возможно зарегистрировать КР-спектры только кофейной кислоты при максимальной мощности (80 мВт), однако полученное соотношение сигнал/шум, которое составило 0.09, является недостаточным для проведения дальнейшего анализа.

Таким образом, проведение мультиплексного анализа возможно только для хлорогеновой и кофейной кислот при использовании лазера с длиной волны 532 нм при мощности около 0.5 мВт.

#### *Оценка влияния белковой матрицы на КР-спектры фенольных кислот*

Для оценки возможности детектирования фенольных кислот в подсолнечном шроте и продуктах его переработки (белковых препаратах) необходимо установить потенциальное влияние белковой матрицы на вид КР-спектров. Для этого провели сравнительный анализ КР-спектров хлорогеновой кислоты, кофейной кислоты и модельного образца белка – БСА. Согласно полученным данным, представленным на **рисунке 48**, перекрывание характеристических полос как между фенольными соединениями, так и с модельным белком отсутствует, а экспериментально полученные КР-спектры БСА согласуются с литературными данными [194, 195] (**таблица 29**).



**Рисунок 48.** Сравнение КР-спектров БСА и фенольных кислот.

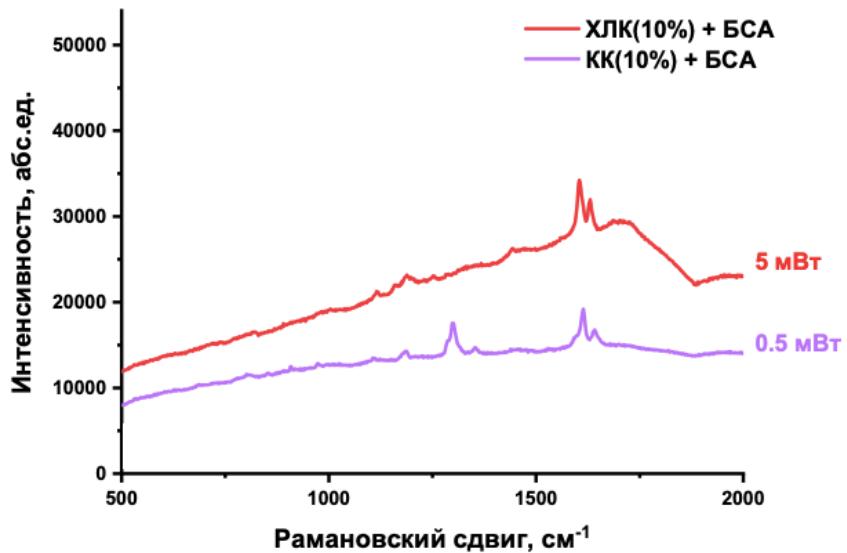
На КР-спектрах хлорогеновой и кофейной кислот наблюдали близкорасположенные полосы в области 1603 и 1632 см<sup>-1</sup> (хлорогеновая кислота), 1616 и 1645 см<sup>-1</sup> (кофейная кислота), которые соответствуют валентным колебаниям C=C в катехоловом фрагменте и этиленовой группе. Наличие характерических линий при 1603 и 1160 см<sup>-1</sup> делает возможным установление факта наличия или отсутствия хлорогеновой кислоты в образце. Для кофейной кислоты характерны полосы при 1603 см<sup>-1</sup>, а также 1160 см<sup>-1</sup>.

**Таблица 32.** Сопоставление экспериментальных и теоретических КР-спектров БСА

Рамановский сдвиг, см <sup>-1</sup> Экспериментальные данные	Рамановский сдвиг, см <sup>-1</sup> Теоретические данные	Колебания
933	937	$\nu(\text{C-C-N})_{(\alpha\text{-спираль})}$
1003	1003	Phe. + Trp
1098	1101	Tyr + Phe.
1205	1207	C-N
1339	1336	$\delta(\text{C-H})$
1656	1654	Amide I

Для оценки влияния белковой матрицы приготовлены модельные образцы фенольных кислот в смеси с БСА (массовое содержание фенольных кислот – 10%), а также выбраны оптимальные условия для регистрации их КР-спектров.

На **рисунке 49** представлены КР-спектры модельных образцов, при воздействии на них лазера с длиной волны 523 нм. На фоне белковой матрицы наблюдаются отчетливые характеристические полосы фенольных кислот.

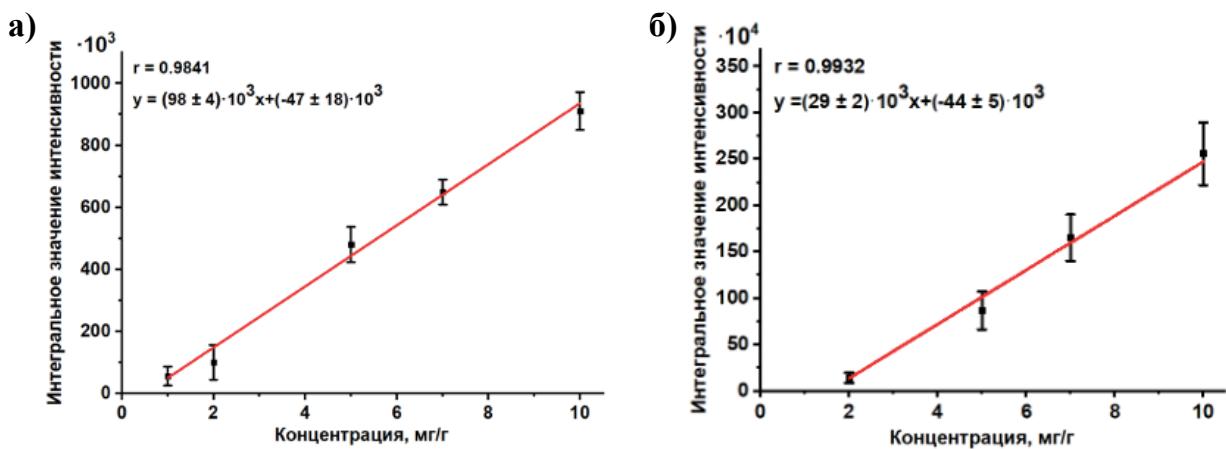


**Рисунок 49.** КР-спектры фенольных кислот в матрице БСА (10 масс.%); время накопления 10 с, количество накоплений 3, объектив 50x, лазер  $\lambda=532$  нм.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что в выбранных условиях КР-спектр БСА характеризуется низким сигналом, следовательно, белковая матрица не должна оказывать влияние на определение исследуемых фенольных соединений в реальном объекте.

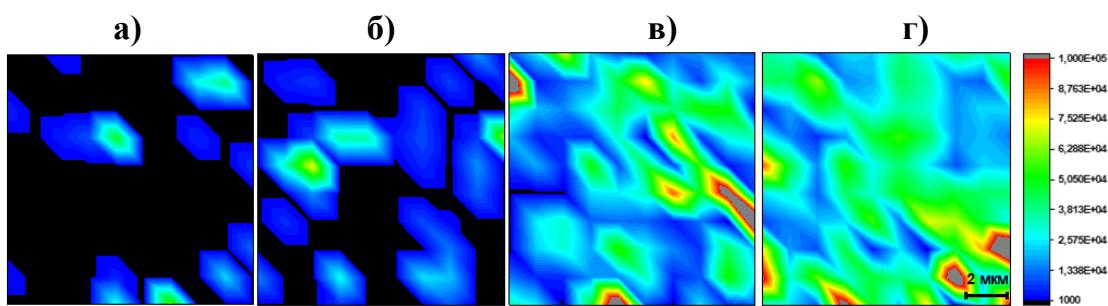
### *Определение фенольных кислот в матрице БСА*

На **рисунке 50** представлены градуировочные зависимости для определения хлорогеновой и кофейной кислот в матрице БСА, полученные методом КР-картирования. Установлен линейный диапазон определяемых содержаний фенольных соединений: для хлорогеновой – 1-10 мг/г, для кофейной кислоты – 2-10 мг/г. Однородное распределение аналита в белковой матрице и ровную поверхность исследуемого образца обеспечивали за счет формирования таблеток.

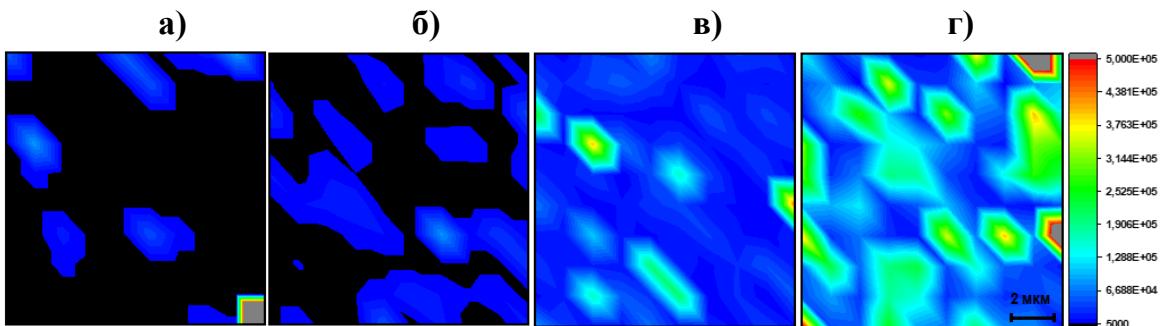


**Рисунок 50.** Градуировочные зависимости для определения в белковой матрице а) хлорогеновой кислоты, б) кофейной кислоты.

Значительная ширина доверительных интервалов и высокие значения относительного стандартного отклонения (таблица 33) связаны с особенностями анализа: использование лазера с диаметром пучка  $\sim 2$  мкм и объектива с 50х увеличением. Данные условия приводят к низкой вероятности попадания пучка излучения на частицы аналита, распределенного в белковой матрице в относительно низких концентрациях. Для компенсации этого эффекта применили КР-картирование (рисунки 51 и 52) со сбором большого количества КР-спектров с шагом 555 мкм, что позволило получить репрезентативную статистику (100 точек на образец).



**Рисунок 51.** КР-карты таблеток БСА с содержанием хлорогеновой кислоты а) 1 масс.%, б) 2 масс.%, в) 5 масс.%, г) 10 масс.% ( $\lambda=532$  нм,  $P=5$  мВт,  $t=10$  с, число накоплений 2, объектив 50x).



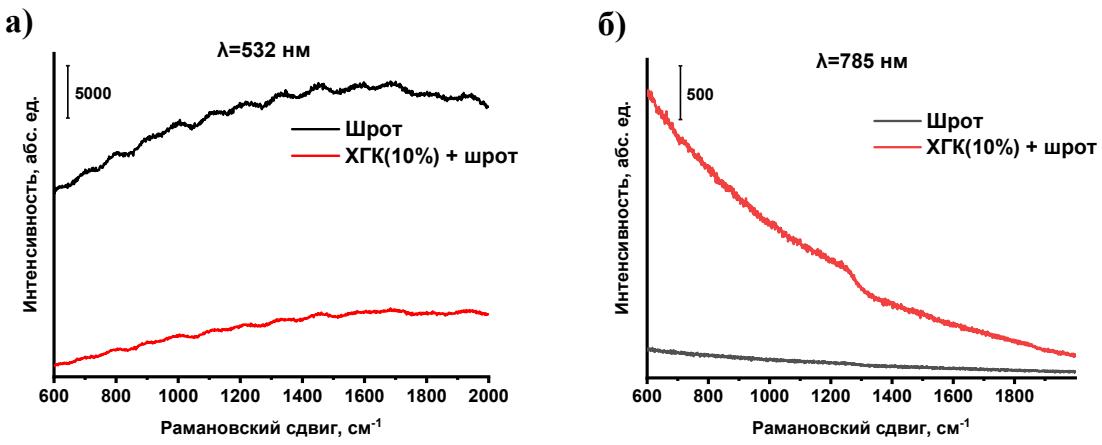
**Рисунок 52.** КР-карты таблеток БСА с содержанием кофейной кислоты а) 1 масс.%, б) 2 масс.%, в) 5 масс.%, г) 10 масс.% ( $\lambda=532$  нм, Р=5 мВт, t=10 с, число накоплений 2, объектив 50x).

**Таблица 33.** Метрологические характеристики методики определения хлорогеновой и кофейной кислот в матрице БСА с помощью КР-спектроскопии

Определяемое вещество	Диапазон определяемых содержаний, мг/г	$C_{\min}$ , мг/г	Коэффиц. корреляции, г	$s_r$ (при $C_{\text{ниж.}}, n=5$ , Р=0.95)
Хлорогеновая кислота	1 – 10	0.5	0.9841	0.22
Кофейная кислота	2 – 10	1.5	0.9909	0.17

### *Влияние матрицы подсолнечного шрота на КР-спектр фенольных кислот*

Для оценки влияния матрицы подсолнечного шрота на вид КР-спектра хлорогеновой кислоты формировали таблетки, содержащие 10 масс.% ХГК и 90 масс.% шрота, после чего регистрировали их КР спектры с использованием лазеров с длинами волн 532 и 785 нм. Воздействие излучения с длиной волны 532 нм на подсолнечный шрот вызывает интенсивный фоновый сигнал. Добавление хлорогеновой кислоты (10 масс.%) приводит к незначительному снижению фона, однако характеристические полосы аналита в КР-спектре остаются неразличимыми (рисунок 53а). При возбуждении лазером с длиной волны 785 нм наблюдали противоположный эффект: подсолнечный шрот демонстрирует низкий фоновый сигнал, однако после внесения хлорогеновой кислоты интенсивность фона значительно возрастает (рисунок 53б). Как и в случае использования «зеленого» лазера, идентификация хлорогеновой кислоты в матрице подсолнечного шрота остается невозможным.



**Рисунок 53.** КР-спектры смеси 10 масс.% хлорогеновой кислоты и 90 масс.% подсолнечного шрота, а)  $\lambda=532$  нм,  $P=0,5$  мВт,  $t=3$  с, число накоплений 3, объектив 50х, б)  $\lambda=785$  нм,  $P=9$  мВт,  $t=3$  с, число накоплений 3, объектив 50х.

Оптимизация условий тушения фонового сигнала матрицей шрота требует дополнительных исследований. Согласно литературным данным, перспективными альтернативными материалами для тушения фона в КР-спектроскопии могут стать графеноподобные материалы [196, 197].

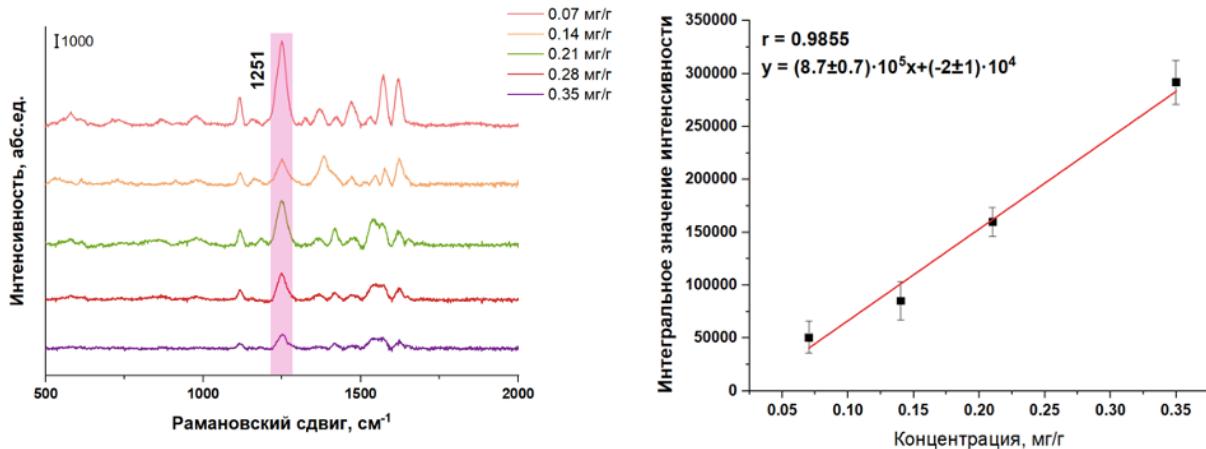
Таким образом, спектроскопия комбинационного рассеяния представляет собой экспрессный метод, перспективный для анализа растительных белков на содержание хлорогеновой и кофейной кислот. Повышение чувствительности и снижение предела обнаружения в дальнейшем могут быть достигнуты за счет применения современного метода спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния.

В целях повышения чувствительности определения фенольных соединений и улучшения соотношения сигнал/шум было предложено перейти от метода КР к методу гигантского комбинационного рассеяния (ГКР).

### 7.2.5 Определение фенольных соединений методом спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР)

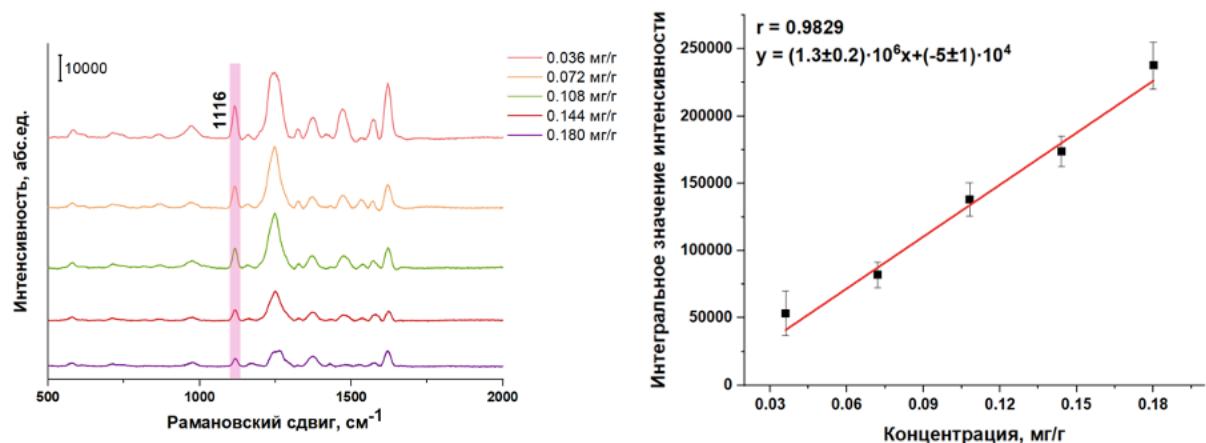
Возможность применения метода спектроскопии ГКР изучали на сенсорной поверхности, состоящей из медной фольги (Cu), модифицированной наночастицами серебра (AgNP). На первом этапе зарегистрировали ГКР-спектры полученных сенсорных подложек и убедились в отсутствие сигналов, что исключает возможность спектральных наложений. Усиливающую способность сенсорного элемента проверили на раман-активном соединении родамине 6G.

При использовании подложки Cu-AgNP для хлорогеновой кислоты наблюдали характеристический пик в области  $1251\text{ см}^{-1}$ , а также линейную зависимость интегрального значения интенсивности сигнала от концентрации в диапазоне 70-350 мкг/г (**рисунок 54**).



**Рисунок 54.** ГКР-спектры хлорогеновой кислоты и соответствующая градуировочная зависимость ( $\lambda=638\text{ нм}$ ; время накопления – 3 с, число накоплений – 5; мощность лазера – 30 мВт; объектив – 20x)

Для кофейной кислоты характеристические полосы наблюдали в области  $1116\text{ см}^{-1}$  и, аналогично, линейную зависимость интегрального значения интенсивности сигнала от концентрации в диапазоне 36-180 мкг/г (**рисунок 55**).



**Рисунок 55.** ГКР-спектры кофейной кислоты и соответствующая градуировочная зависимость ( $\lambda=638\text{ нм}$ ; время накопления – 3 с, число накоплений – 5; мощность лазера – 30 мВт; объектив – 20x).

Сравнение метрологических характеристик определения фенольных кислот методом ГКР-спектроскопии на двух типах сенсорных подложек представлено в **таблице 34**.

**Таблица 34.** Метрологические характеристики методики определения хлорогеновой и кофейной кислот методом ГКР-спектроскопии

Определяемое соединение	Диапазон определяемых содержаний, мкг/г	C <sub>min.</sub> , мкг/г	Коэффиц. корреляции, r	s <sub>r</sub> (при C <sub>ниж.</sub> , n=5, P=0.95)
Хлорогеновая кислота	70 – 350	0.2	0.9855	0.12
Кофейная кислота	36 – 180	1.1	0.9829	0.09

Предложенная сенсорная поверхность Cu-AgNP позволяет проводить определение хлорогеновой кислоты и кофейной кислоты в исследуемом диапазоне концентраций, что делает ее перспективной для использования в целях контроля качества белков подсолнечника, содержащих следовые количества фенольных соединений для этого объекта.

## **Заключение**

В результате проведенных исследований поставленные задачи решены, а цель работы достигнута. Основные результаты, полученные в ходе выполнения работы, представлены ниже.

Изучено влияние основных параметров извлечения белка из подсолнечного шрота (рН и гидромодуль) из первичного растительного сырья. Предложена замена классического способа извлечения белка с использованием гидроксида калия в качестве растворителя на применение аммиачного раствора с целью сокращения нежелательных солевых стоков.

Установлены условия извлечения белка, при которых происходит его необратимое связывание с продуктами окисления фенольных соединений. Для решения этой проблемы впервые предложено добавление антиоксиданта в реакционную систему при сохранении оптимального рН раствора, а также внесение антиоксиданта в маточный раствор после отделения твердого осадка для получения конечного белкового препарата от белого до кремового цвета.

Впервые предложено выделение белка из маточного раствора с помощью флотации с использованием органического растворителя вместо его осаждения в изоэлектрической точке, что способствует увеличению степени извлечения белка. Выбраны оптимальные условия флотации: рН маточного раствора и соотношение фаз. В качестве растворителя предложено использовать нефрас, разрешенный для применения в пищевой промышленности.

В качестве дополнительной стадии очистки с целью получения белковых изолятов высокой степени чистоты предложено использование сверхкритической флюидной СО<sub>2</sub>-экстракции.

Разработанный в ходе исследования подход к выделению белка из подсолнечного шрота успешно масштабирован в 25 раз и апробирован на пилотной установке.

Установлено, что для определения общего количества белка в растительных объектах наиболее подходящим является использование азотометрического метода Дюма в tandemе со спектрофотометрическим методом Лоури, в основе которого лежит реакция на пептидные связи. При этом, достаточно высокая чувствительность

метода (предел обнаружения 9.7 мкг/мл) позволяет исключить мешающее влияние компонентов матрицы (полисахаридов и фенольных соединений).

Выбраны оптимальные условия выделения фенольных соединений из исходного сырья. С помощью ВЭЖХ определено, что основным фенольным соединением подсолнечного шрота является хлорогеновая кислота. Выбраны хроматографические условия для ее определения (предел обнаружения 0.01 мкг/мл), что можно использовать в качестве «золотого стандарта» для контроля ее содержания на всех стадиях технологического процесса.

С использованием метода ВЭЖХ подтверждено, что с помощью разработанного подхода удается сократить содержание хлорогеновой кислоты в получаемом белковом препарате примерно в 100 раз по сравнению с исходным сырьем.

Разработан подход к недеструктивному анализу хлорогеновой кислоты в первичном растительном сырье с помощью ИК-спектроскопии с пределом обнаружения 0.2 мг/г. Результаты определения хлорогеновой кислоты в образце подсолнечного шрота данным методом подтверждены ВЭЖХ, а также двумя спектрофотометрическими методами. Продемонстрирована принципиальная возможность оценки качества белковых препаратов (по содержанию хлорогеновой и кофейной кислот) методом спектроскопии ГКР в диапазоне концентраций 70 – 350 мкг/г для хлорогеновой и 36 – 180 мкг/г для кофейной кислоты.

## **Выводы**

1. Предложен способ выделения белка из маточного раствора методом флотации с использованием органических растворителей. Выбраны оптимальные значения pH маточного раствора и соотношение фаз, которые позволяют достичь повышения выхода белкового препарата до 90-96 масс. % и сокращения количества солевых отходов по сравнению с литературными аналогами в 40 раз.
2. Разработан способ предотвращения окисления фенольных соединений кислородом воздуха в условиях выделения белка подсолнечника для получения чистых протеиновых препаратов.
3. Предложена методика определения основного фенольного соединения подсолнечного шрота – хлорогеновой кислоты – методом ВЭЖХ с УФ-детектированием с пределом обнаружения 0.01 мкг/мл.
4. Разработан способ контроля качества подсолнечного белка по его содержанию в исходном сырье и продуктах переработки с использованием автоматизированного и экспрессного азотометрического метода Дюма в тандеме со спектрофотометрическим методом Лоури (предел обнаружения 9.7 мкг/мл) для подтверждения белковой природы азота в растительном сырье.
5. На примере определения хлорогеновой кислоты в подсолнечном шроте разработан подход к недеструктивному анализу растительного сырья и продуктов его переработки на содержание фенольных соединений методами ИК-спектроскопии с пределом обнаружения 0.2 мг/г и КР спектроскопии с пределом обнаружения 0.5 мг/г.
6. Для контроля содержания хлорогеновой и кофейной кислот в белковых изолятах разработана методика их определения методом ГКР с использованием сенсорного элемента на основе меди и наночастиц серебра (Cu-AgNP) с пределами обнаружения 0.2 и 1.1 мкг/г, соответственно.

## **Список литературы**

1. *Akharume F.U., Aluko R.E., Adedeji A.A.* Modification of plant proteins for improved functionality: A review // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2021. V. 20. № 1. P. 198-224.
2. *Chmielewska A., Kozłowska M., Rachwał D., Wnukowski P., Amarowicz R., Nebesny E., Rosicka-Kaczmarek J.* Canola/rapeseed protein - nutritional value, functionality and food application: a review // Critical reviews in food science and nutrition. 2020. V. 61. P. 1-21.
3. *Sun-Waterhouse D., Zhao M., Waterhouse G.* Protein Modification During Ingredient Preparation and Food Processing: Approaches to Improve Food Processability and Nutrition // Food and Bioprocess Technology. 2014. V. 7.
4. *Boukid F.* Plant-based meat analogues: from niche to mainstream // European Food Research and Technology. 2021. V. 247.
5. *Iqbal A., Khalil I., Ateeq N., Khan M.* Nutritional quality of important food legumes // Food Chemistry. 2006. V. 97. P. 331-335.
6. *Maningat C., Jeradechachai T., Buttshaw M.* Textured Wheat and Pea Proteins for Meat Alternative Applications // Cereal Chemistry. 2021. V. 99.
7. *Day L.* Proteins from land plants – Potential resources for human nutrition and food security // Trends in Food Science & Technology. 2013. V. 32. P. 25-42.
8. *Acquah C., Zhang Y., Dubé M., Udenigwe C.* Formation and characterization of protein-based films from yellow pea (*Pisum sativum*) protein isolate and concentrate for edible applications // 2020. V. 2. P. 61-69.
9. *Millar K.A., Gallagher E., Burke R., McCarthy S., Barry-Ryan C.* Proximate composition and anti-nutritional factors of fava-bean (*Vicia faba*), green-pea and yellow-pea (*Pisum sativum*) flour // Journal of Food Composition and Analysis. 2019. V. 82. P. 103233.
10. *Stone A.K., Karalash A., Tyler R.T., Warkentin T.D., Nickerson M.T.* Functional attributes of pea protein isolates prepared using different extraction methods and cultivars // Food Research International. 2015. V. 76. P. 31-38.
11. *Kumitch H., Stone A., Nosworthy M., Nickerson M., House J., Korber D., Tanaka T.* Effect of fermentation time on the nutritional properties of pea protein enriched flour fermented by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* // Cereal Chemistry. 2019. V. 97.

12. *Preece K., Hooshyar N., Zuidam N.J.* Whole soybean protein extraction processes: A review // Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2017. V. 43.
13. *Alibhai Z., Mondor M., Moresoli C., Lamarche F.* Production of soy protein concentrates/isolates: Traditional and membrane technologies // Desalination. 2006. V. 191. P. 351-358.
14. *Kitamura K.* Genetic Improvement of Nutritional and Food Processing Quality in Soybean // JOURNAL OF THE BREWING SOCIETY OF JAPAN. 1994. V. 89. № 12. P. 926-931.
15. *Yamauchi F., Yamagishi T., Iwabuchi S.* Molecular understanding of heat-induced phenomena of soybean protein // Food Reviews International. 1991. V. 7. № 3. P. 283-322.
16. *Riblett A.L., Herald T.J., Schmidt K.A., Tilley K.A.* Characterization of beta-conglycinin and glycinin soy protein fractions from four selected soybean genotypes // Journal of agricultural and food chemistry. 2001. V. 49. № 10. P. 4983-4989.
17. *Wang T., Qin G.-X., Sun Z.-W., Zhao Y.* Advances of Research on Glycinin and  $\beta$ -Conglycinin: A Review of Two Major Soybean Allergenic Proteins // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2014. V. 54. P. 850-862.
18. *Shanthakumar P., Klepacka J., Bains A., Chawla P., Dhull S., Najda A.* The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry // Molecules. 2022. V. 27. P. 5354.
19. *Tiong A., Crawford S., Jones N., McKinley G., Batchelor W., Hag L.* Pea and soy protein isolate fractal gels: The role of protein composition, structure and solubility on their gelation behaviour // Food Structure. 2024. V. 40. P. 100374.
20. *Sanchez-Monge R.G., Lopez-Torrejón G., Pascual C., Varela J., Martin-Estebe M., Salcedo G.* Vicilin and convicilin are potential major allergen from pea // Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology. 2004. V. 34. P. 1747-1753.
21. *Ma Z., Boye J., Simpson B.* Preparation of Salad Dressing Emulsions Using Lentil, Chickpea and Pea Protein Isolates: A Response Surface Methodology Study // Journal of Food Quality. 2016. V. 39.
22. *Shevkani K., Singh N.* Influence of kidney bean, field pea and amaranth protein isolates on the characteristics of starch-based gluten-free muffins // International Journal of Food Science & Technology. 2014. V. 49.

23. *Shewry P.* Can we increase the use of wheat and other cereals as sources of protein? // Journal of Cereal Science. 2024. V. 117. P. 103899.
24. *Mota C., Santos M., Mauro R., Samman N., Matos A., Torres D., Castanheira I.* Protein content and amino acids profile of pseudocereals // Food Chemistry. 2014. V. 193.
25. *Guerrieri N. N.* Cereal Proteins in: Proteins in food processing // Ed. Yada R.Y., CRC, Capitolo 8. 2004. P.176-196.
26. *Torres E., Santa-María C., Miramontes E., Bautista Palomas J.D., García-Martínez A., Cremades O., Cert R., Parrado J.* Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran // Food Research International. 2009. V. 42. P. 387-393.
27. *Gamel T., Linssen J., Alink G.M., Mosallem A., Shekib L.* Nutritional study of raw and popped seed proteins of Amaranthus caudatus L and Amaranthuscaudatus L // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004. V. 84. P. 1153-1158.
28. *Arrutia F., Binner E., Williams P., Waldron K.* Oilseeds beyond oil: Press cakes and meals supplying global protein requirements // Trends in Food Science & Technology. 2020. V. 100.
29. *Wanasundara P., McIntosh T., Perera S., Withana-Gamage T., Mitra P.* Canola/rapeseed protein-functionality and nutrition // Oilseeds and fats, Crops and Lipids. 2016. V. 23.
30. *Akbari A., Wu J.* An integrated method of isolating napin and cruciferin from defatted canola meal // LWT - Food Science and Technology. 2015. V. 64.
31. *Oskoueian E., Abdullah N., Hendra R., Karimi E.* Bioactive Compounds, Antioxidant, Xanthine Oxidase Inhibitory, Tyrosinase Inhibitory and Anti-Inflammatory Activities of Selected Agro-Industrial By-products // International journal of molecular sciences. 2011. V. 12. P. 8610-8625.
32. *Guo Y., An H., Feng L., Liu Q., Wang S., Zhang T.* Sinapine as an active compound for inhibiting the proliferation of Caco-2 cells via downregulation of P-glycoprotein // Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association. 2014. V. 67. P. 187-192.
33. *González-Pérez S., Vereijken J.* Sunflower proteins: Overview of their physicochemical, structural and functional properties // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2007. V. 12. 2007. V. 87.

34. *González-Pérez S., Merck K.B., Vereijken J.M., Van Koningsveld G.A., Gruppen H., Voragen A.G.* Isolation and characterization of undenatured chlorogenic acid free sunflower (*Helianthus annuus*) proteins // Journal of agricultural and food chemistry. 2002. V. 50. № 6. P. 1713-1719.
35. *Kreps F., Vrbiková L., Schmidt S.* Industrial Rapeseed and Sunflower Meal as Source of Antioxidants // International Journal of Engineering Research and Applications. 2014. V. 4. P. 45-54.
36. *Sabir M.A., Sosulski F.W., Kernan J.A.* Phenolic constituents in sunflower flour // Journal of agricultural and food chemistry. 1974. V. 22. № 4. P. 572-574.
37. *Kaur R., Ghoshal G.* Sunflower protein isolates-composition, extraction and functional properties // Advances in Colloid and Interface Science. 2022. V. 306. P. 102725.
38. *Hadidi M., Aghababaei F., McClements D.* Sunflower meal/cake as a sustainable protein source for global food demand: Towards a zero-hunger world // Food Hydrocolloids. 2023. V. 147. P. 109329.
39. *Sá A., Moreno Y., Carciofi B.* Plant proteins as high-quality nutritional source for human diet // Trends in Food Science & Technology. 2020. V. 97.
40. *Поморова Ю., Пятовский В., Бескоровайный Д., Серова Ю., Болховитина Ю.* Сравнительный анализ аминокислотного состава белка семян подсолнечника селекции ФГБНУ ФНЦ ВНИИМК // Масличные культуры. 2020. V. 1. № 181. P. 31-37.
41. *Osborne T.B.* The vegetable proteins. Longmans, Green and Company, 1924.
42. *Žilić S., Barac M., Pešić M., Crevar M., Stanojevic S., Nisavic A., Goran S., Miodrag T.* Characterization of sunflower seed and kernel proteins // Helia. 2010. V. 33. P. 103-115.
43. *Gultekin Subasi B., Saricaoglu B., Capanoglu E., Mohammadifar M.A.* A review on protein extracts from sunflower cake: techno-functional properties and promising modification methods // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2021. V. 62. P. 1-16.
44. *Zayas J.F.* Functionality of proteins in food. Springer science & business media. 2012.

45. *Dabbour M., He R., Ma H., Musa A.* Optimization of ultrasound assisted extraction of protein from sunflower meal and its physicochemical and functional properties // Journal of Food Process Engineering. 2018. V. 41. P. e12799.
46. *Le Priol L., Dagmey A., Morandat S., Saleh K., Kirat K., Nesterenko A.* Comparative study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation // Food Hydrocolloids. 2019. V. 95.
47. *Rahma H., Rao M.* Characterisation of sunflower proteins // Journal of Food Science. 2006. V. 44. P. 579-582.
48. *Ivanova P., Chalova V., Koleva L., Pishtiyiski I., Perifanova-Nemska M.* Optimization of protein extraction from sunflower meal produced in Bulgaria // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2012. V. 18. P. 153-160.
49. *Salgado P., Ortiz S., Petruccelli S., Mauri A.* Functional Food Ingredients Based on Sunflower Protein Concentrates Naturally Enriched with Antioxidant Phenolic Compounds // Journal of the American Oil Chemists' Society. 2012. V. 89. P. 825-836.
50. *Alexandrino T., Ferrari R., Oliveira L., S.C.Ormeneze R., Pacheco M.T.* Fractioning of the sunflower flour components: Physical, chemical and nutritional evaluation of the fractions // LWT - Food Science and Technology. 2017. V. 84.
51. *Lin M.J.Y., Humbert E.S., Sosulski F.W.* Certain functional properties of sunflower meal products // Journal of Food Science. 1974. V. 39. № 2. P. 368-370.
52. *Sosulski F., Fleming S.E.* Chemical, functional, and nutritional properties of sunflower protein products // J Am Oil Chem Soc. 1977. V. 54. № 2. P. 100-104.
53. *Salgado P., López-Caballero M., Gomez-Guillen M., Mauri A., Montero P.* Exploration of the antioxidant and antimicrobial capacity of two sunflower protein concentrate films with naturally present phenolic compounds // Food Hydrocolloids. 2012. V. 29. P. 374–381.
54. *Pickardt C., Eisner P., Kammerer D.R., Carle R.* Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake by mild-acidic protein extraction and polyphenol adsorption // Food Hydrocolloids. 2015. V. 44. P. 208-219.
55. *Malik M., Saini C.* Heat treatment of sunflower protein isolates near isoelectric point: Effect on rheological and structural properties // Food Chemistry. 2018. V. 276.

56. *Sánchez Gimeno A., Burgos J.* Factors Affecting the Gelation Properties of Hydrolyzed Sunflower Proteins // Journal of Food Science. 2006. V. 62. P. 284-288.
57. *Albe Slabi S., Mathé C., Basselin M., Framboisier X., Ndiaye M., Galet O., Kapel R.* Multi-objective optimization of solid/liquid extraction of total sunflower proteins from cold press meal // Food Chemistry. 2020. V. 317. P. 126423.
58. *Albe Slabi S., Mathé C., Basselin M., Fournier F., Aymes A., Bianeis M., Galet O., Kapel R.* Optimization of sunflower albumin extraction from oleaginous meal and characterization of their structure and properties // Food Hydrocolloids. 2019. V. 99. P. 105335.
59. *Щеколдина Т.В.* Технологии получения белоксодержащего сырья из продуктов переработки семян подсолнечника // Политехнический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2015. V. 109. P. 360-378.
60. *Псаломщиков Е., Дорошенко В., Олейник Д.* Обзор методов получения концентрата и изолята белка их жмыха и шрота подсолнечника // Современные проблемы техники и технологии пищевых производств: материалы. 2022. Р. 198.
61. *Mondor M., Hernandez Alvarez A.J.* Processing Technologies to Produce Plant Protein Concentrates and Isolates // Plant Protein Foods. 2022. P. 61-108.
62. *Щербаков В., Иваницкий С.* Производство белковых продуктов из масличных семян // Москва: Агропромиздат. 1987. Р.152.
63. Патент № 2233097. Способ получения белкового изолята из содержащего белок вещества / Ноймюллер Вальдемар. 2004.
64. Патент № 2314705. Непрерывный способ получения белкового изолята из семян масличных культур / Баркер Лэрри Д., Грин Брент Эверетт, Лей Ксу. 2005.
65. Патент № 2340203. Способ получения пищевого белкового изолята из подсолнечного шрота / Лобанов В.Г., Кудинов П.И., Бочкова Л.К., Щеколдина Т.В., Чалова И.А. 2008.
66. *Robbins R.J.* Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology // Journal of agricultural and food chemistry. 2003. V. 51. № 10. P. 2866-2887.
67. *Dobes J., Zitka O., Sochor J., Ruttikay-Nedecky B., Babula P., Beklova M., Kynicky J., Hubalek J., Klejdus B., Kizek R., Adam V.* Electrochemical Tools for Determination of

Phenolic Compounds in Plants. A Review // International Journal of Electrochemical Science. 2013. V. 8. P. 4520-4542.

68. *Chirinos R., Pallardel I., Huamán A., Arbizu C., Pedreschi R., Campos D.* HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity // Food Chemistry. 2009. V. 113. P. 1243-1251.
69. *Heleno S.A., Martins A., Queiroz M.J.R.P., Ferreira I.C.F.R.* Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review // Food Chemistry. 2015. V. 173. P. 501-513.
70. *Pereira D., Valentão P., Pereira J., Andrade P.* Phenolics: From Chemistry to Biology // Molecules. 2009. V. 14.
71. *Khoddami A., Wilkes M., Roberts T.* Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds // Molecules. 2013. V. 18. P. 2328-2375.
72. *Левицький А., Вертикова О., Селіванська І.* Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология // Мікробіологія і біотехнологія. 2010. V. 2 № 10. P. 6-21.
73. *Kumar N., Goel N.* Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications // Biotechnology Reports. 2019. V. 24. P. e00370.
74. *Wildermuth S., Young E., Were L.* Chlorogenic Acid Oxidation and Its Reaction with Sunflower Proteins to Form Green-Colored Complexes // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2016. V. 15.
75. *Osborne T.B., Campbell G.F.* The proteids of the sunflower seed // Journal of the American Chemical Society. 1897. V. 19, № 6. P. 487-494.
76. *Gorter K.* Identity of helianthic acid with chlorogenic acid // Archiv der Pharmazie. 1909. V. 247. P. 436-440.
77. *Rudkin G.O., Nelson J.* Chlorogenic acid and respiration of sweet potatoes // Journal of the American Chemical Society. 1947. V. 69. № 6. P. 1470-1475.
78. *Sarker D.K., Wilde P.J., Clark D.C.* Control of Surfactant-Induced Destabilization of Foams through Polyphenol-Mediated Protein-Protein Interactions // Journal of agricultural and food chemistry. 1995. V. 43. № 2. P. 295-300.
79. *Rossetti D., Yakubov G., Stokes J., Williamson A.-M., Fuller G.* Interaction of Human Whole Saliva with astringent dietary compounds investigated by interfacial rheology // Food Hydrocolloids. 2008. V. 22. P. 1068-1078.

80. *Le Bourvellec C., Renard C.* Interactions between Polyphenols and Macromolecules: Quantification Methods and Mechanisms // Critical reviews in food science and nutrition. 2012. V. 52. P. 213-248.
81. *Balasundram N., Sundram K., Samman S.* Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses // Food Chemistry. 2006. V. 99. P. 191-203.
82. *Salgado P., Drago S., Ortiz S., Petruccelli S., Andrich O., González R., Mauri A.* Production and characterization of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein-enriched products obtained at pilot plant scale // LWT - Food Science and Technology. 2012. V. 45. P. 65-72.
83. *Saeed M., Cheryan M.* Chlorogenic acid interactions with sunflower proteins // Journal of agricultural and food chemistry. 1989. V. 37. № 5. P. 1270-1274.
84. *Rawel H., Rohn S.* Nature of hydroxycinnamate-protein interactions // Phytochemistry Reviews. 2009. V. 9. P. 93-109.
85. *Bittner S.* When quinones meet amino acids: Chemical, physical and biological consequences // Amino acids. 2006. V. 30. P. 205-224.
86. *Namiki M., Yabuta G., Koizumi Y., Yano M.* Development of free radical products during the greening reaction of caffeic acid esters (or chlorogenic acid) and a primary amino compound // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2001. V. 65. № 10. P. 2131-2136.
87. *Yabuta G., Koizumi Y., Namiki K., Hida M., Namiki M.* Structure of Green Pigment Formed by the Reaction of Caffeic Acid Esters (or chlorogenic acid) with a Primary Amino Compound // Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2001. V. 65. P. 2121-2130.
88. *Gu L., Peng N., Chang C., McClements D.J., Su Y., Yang Y.* Fabrication of surface-active antioxidant food biopolymers: Conjugation of catechin polymers to egg white proteins // Food Biophysics. 2017. V. 12. P. 198-210.
89. *Liu F., Sun C., Yang W., Yuan F., Gao Y.* Structural characterization and functional evaluation of lactoferrin-polyphenol conjugates formed by free-radical graft copolymerization // RSC Advances. 2015. V. 5.
90. *Spizzirri U., Iemma F., Puoci F., Cirillo G., Curcio M., Parisi O., Picci N.* Synthesis of Antioxidant Polymers by Grafting of Gallic Acid and Catechin on Gelatin // Biomacromolecules. 2009. V. 10. P. 1923-1930.

91. *Yoruk R., Marshall M.* Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review // Journal of Food Biochemistry. 2003. V. 27. P. 361-422.
92. *Maegawa Y., Sugino K., Sakurai H.* Identification of free radical species derived from caffeic acid and related polyphenols // Free radical research. 2007. V. 41. № 1. P. 110-119.
93. *Sripad G., Rao M.S.N.* Effect of methods to remove polyphenols from sunflower meal on the physicochemical properties of the proteins // Journal of agricultural and food chemistry. 1987. V. 35. № 6. P. 962-967.
94. *Sodini G., Canella M.* Acidic butanol removal of color-forming phenols from sunflower meal // Journal of agricultural and food chemistry. 1977. V. 25. № 4. P. 822-825.
95. *Jia W., Kyriakopoulou K., Roelofs B., Ndiaye M., Vincken J.-P., Keppler J., Goot A.J.* Removal of phenolic compounds from de-oiled sunflower kernels by aqueous ethanol washing // Food Chemistry. 2021. V. 362. P. 130204.
96. *Yusoff I., Taher Z., Rahmat Z., Chua L.S.* A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins // Food Research International. 2022. V. 157. P. 111268.
97. *Nkhili E., Tomao V., El Hajji H., Boustani E.-S., Chemat F., Dangles O.* Microwave-assisted Water Extraction of Green Tea Polyphenols // Phytochemical analysis : PCA. 2009. V. 20. P. 408-415.
98. *Pan X., Niu G., Liu H.* Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves // Chemical Engineering and Processing. 2003. V. 42. P. 129-133.
99. *Silva N., Sabino L., Oliveira L., Barros L., Sousa P.* Effect of food additives on the antioxidant properties and microbiological quality of red guava juice // Revista Ciencia Agronomica. 2016. V. 47.
100. *Sembiring A., Nurminah M., Nainggolan R.* Effect of sodium metabisulphite concentration and salt concentration on the physicochemical properties of durian seed flour // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 2020. V. 454. P. 012107.
101. *Nardini M., Garaguso I.* Effect of Sulfites on Antioxidant Activity, Total Polyphenols, and Flavonoid Measurements in White Wine // Foods. 2018. V. 7. P. 35.

102. *Tomanová M., Jedinák L., Cankař P.* Reductive dehalogenation and dehalogenative sulfonation of phenols and heteroaromatics with sodium sulfite in an aqueous medium // *Green Chemistry*. 2019. V. 21. P. 2621-2628.
103. *Лобанов В., Стрыгина М.* Фенольный комплекс семян подсолнечника // *Известия высших учебных заведений. Пищевая технология*. 2004. V. 1. P. 41-43.
104. *Shchekoldina T., Aider M.* Production of low chlorogenic and caffeic acid containing sunflower meal protein isolate and its use in functional wheat bread making // *Journal of food science and technology*. 2014. V. 51. № 10. P. 2331-2343.
105. *Косарева О., Родионова Л.* Разработка технологии подготовки корзинок-соцветий подсолнечника для получения пищевого пектинового экстракта // *Научный журнал КубГАУ*. 2016. V. 123.
106. *Soylak M., Ozalp O., Uzcan F.* Magnetic nanomaterials for the removal, separation and preconcentration of organic and inorganic pollutants at trace levels and their practical applications: A review // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2021. V. 29. P. e00109.
107. *Khabibullin V.R., Ratova D.-M.V., Andreeva K.O., Vershinina Y.S., Mikheev I.V., Shtykov S.N., Proskurnin M.A.* Photothermal Evaluation of Aqueous Magnetite Nanodispersions: Accuracy, Precision, and Limitations // *Molecules*. 2025. V. 30. P. 4084.
108. *Gubin A.S., Sukhanov P.T., Kushnir A.A.* Magnetic sorbent modified by humate for the extraction of alkylphenols, bisphenol A and estradiol // *Mendeleev Communications*. 2023. V. 33. № 2. P. 285-286.
109. *World Health Organization, Food and Agriculture Organization of The United Nation.* Cereals, pulses, legumes and vegetable proteins. 2007.
110. *Wilson K., Walker J.* Principles and techniques of practical biochemistry. New York, USA: Cambridge University Press. 1994. P. 620.
111. *Kjeldahl C.* A new method for the determination of nitrogen in organic matter // *Zeitschrift fur Analytische Chemie*. 1883. V. 22. P. 366.
112. *Hayes M.* Measuring protein content in food: An overview of methods // *Foods*. 2020. V. 9. № 10. P. 1340.
113. *Saint-Denis T., Goupy J.* Optimization of a nitrogen analyser based on the Dumas method // *Analytica Chimica Acta*. 2004. V. 515. P. 191-198.

114. *Simonne A., Simonne E., Eitenmiller R., Mills H., Iii C.* Could the Dumas Method Replace the Kjeldahl Digestion for Nitrogen and Crude Protein Determinations in Foods? // Journal of the Science of Food and Agriculture. 1997. V. 73. P. 39-45.
115. *Finete V., Gouvêa M., Marques F., Pereira Netto A.* Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? // Food chemistry. 2013. V. 141. P. 3649-3655.
116. *Goldring J.* Measuring Protein Concentration with Absorbance, Lowry, Bradford Coomassie Blue, or the Smith Bicinchoninic Acid Assay Before Electrophoresis // Methods and Protocols. 2019. P. 31-39.
117. *Simonian M.H.* Spectrophotometric determination of protein concentration // Current Protocols in Cell Biology. 2002. V. 15.
118. *Nakai S., Wilson H.K., Herreid E.O.* Spectrophotometric Determination of Protein in Milk1 // Journal of Dairy Science. 1964. V. 47. № 4. P. 356-358.
119. *Gabor E.* Determination of the protein content of certain meat products by ultraviolet absorption spectrophotometry // Acta Aliment. 1979. V. 8. P. 157-167.
120. *Layne E.* Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins // Method in Enzymology. 1957. P. 447-454.
121. *Robinson H.W., Hogden C.G.* The Biuret reaction in the determination of serum proteins // Journal of Biological Chemistry. 1940. V. 135, № 2. P. 707-725.
122. *Pomeranz Y.* Evaluation of Factors Affecting the Determination of Nitrogen in Soya Products by the Biuret and Orange-G Dye-Binding Methods // Journal of Food Science. 2006. V. 30. P. 307-311.
123. *Jennings A.* Determination of the nitrogen content of cereal grain by colorimetric methods // Ceral Chemistry. 1961. V. 38.
124. *Torten J., Whitaker J.* Evaluation of the biuret and dye-binding methods for protein determination in meats // Journal of Food Science. 1964. V. 29. № 2. P. 168-174.
125. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical biochemistry. 1976. V. 72. P. 248-254.
126. *Chang K.-C.* Protein Analysis // Springer International Publishing. 2017. P. 315-331.

127. *Snyder J.C., Desborough S.L.* Rapid estimation of potato tuber total protein content with coomassie brilliant blue G-250 // Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik. 1978. V. 52. № 3. P. 135-139.
128. *Lewis M., Krumland S., Muhleman D.* Dye-Binding Method for Measurement of Protein in Wort and Beer // Journal of the American Society of Brewing Chemists. 2018. V. 38. P. 37-41.
129. *Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C.* Measurement of protein using bicinchoninic acid // Analytical biochemistry. 1985. V. 150. № 1. P. 76-85.
130. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // The Journal of biological chemistry. 1951. V. 193. № 1. P. 265-275.
131. *Жарехина Т.В., Шаяхметова Л.Н., Гайнутдинова Э.Р., Аскарова А.А.* Питательная ценность кормов растительного происхождения // Нива Татарстана. 2019. № 1-2. P. 61-64.
132. ГОСТ 6865-2015. Метод определения содержания сырой клетчатки.
133. *Михальчук С., Пастухова М.* Анализ достоверности калибровочных моделей для определения сырого протеина, сырой клетчатки и сырого жира в силюсе кукурузном методом БИК-спектрометрии // Животноводство и ветеринарная медицина. 2023. V. 3. P. 41-46.
134. *Безлюдный В., Берестов И.* Определение содержания сырой клетчатки в зерне ярового ячменя с использованием ближней инфракрасной спектроскопии // Земледелие и селекция в Беларуси. 2022. № 54. P. 234-238.
135. *Kays S., Shimizu N., Barton F.E., Ohtsubo K.-I.* Near-Infrared Transmission and Reflectance Spectroscopy for the Determination of Dietary Fiber in Barley Cultivars // Crop Science. 2005. V. 45. P. 2307-2311.
136. *Swain T., Hillis W.* The phenolic constituents of *Prunus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents // Journal of the Science of Food and Agriculture. 1959. V. 10. № 1. P. 63-68.
137. *Martono Y., Yanuarsih F., Aminu N., Muninggar J.* Fractionation and determination of phenolic and flavonoid compound from *Moringa oleifera* leaves // Journal of Physics: Conference Series. 2019. P. 012014.

138. *Dai C., Ma H., He R., Huang L., Zhu S., Ding Q., Luo L.* Improvement of nutritional value and bioactivity of soybean meal by solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* // *LWT - Food Science and Technology*. 2017. V. 86.
139. *Attard E.* A rapid microtitre plate Folin-Ciocalteu method for the assessment of polyphenols // *Central European Journal of Biology*. 2012. V. 8.
140. *Grubesić R.J., Vuković J., Kremer D., Vladimir-Knezević S.* Spectrophotometric method for polyphenols analysis: prevalidation and application on *Plantago L.* species // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005. V. 39. № 3-4. P. 837-842.
141. *Lawag I.L., Nolden E.S., Schaper A.a.M., Lim L.Y., Locher C.* A Modified Folin-Ciocalteu Assay for the Determination of Total Phenolics Content in Honey // *Applied Sciences*. 2023. V. 13. № 4. P. 2135.
142. *Sánchez-Rangel J.C., Benavides J., Heredia J.B., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velázquez D.A.* The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination // *Analytical Methods*. 2013. V. 5. № 21. P. 5990-5999.
143. *Price M.L., Butler L.G.* Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain // *Journal of agricultural and food chemistry*. 1977. V. 25. № 6. P. 1268-1273.
144. *Slimestad R., Vangdal E., Brede C.* Analysis of phenolic compounds in six Norwegian plum cultivars (*Prunus domestica L.*) // *Journal of agricultural and food chemistry*. 2009. V. 57. № 23. P. 11370-11375.
145. *Pueyo I.U., Calvo M.I.* Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content // *Fitoterapia*. 2009. V. 80. № 8. P. 465-467.
146. *Reis F.S., Martins A., Barros L., Ferreira I.C.* Antioxidant properties and phenolic profile of the most widely appreciated cultivated mushrooms: a comparative study between in vivo and in vitro samples // *Food and chemical toxicology*. 2012. V. 50. № 5. P. 1201-1207.
147. *Margraf T., Karnopp A.R., Rosso N.D., Granato D.* Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to Estimate The Total Phenolic Content of Juices and Teas Using 96-Well Microplates // *Journal of Food Science*. 2015. V. 80. № 11. P. 2397-2403.

148. *Gupta D.* Methods for determination of antioxidant capacity: A review // International Journal of Pharmaceutical Science and Research. 2015. V. 6. P. 546-566.
149. *Verica D.-U., Levaj B., Bursać Kovačević D., Sandra P., Radojcic Redovnikovic I., Biško A.* Total Phenolics and Antioxidant Capacity Assays of Selected Fruits // Agriculturae Conspectus Scientificus. 2007. V. 72.
150. *Shams Ardekani M.R., Khanavi M., Hajimahmoodi M., Jahangiri M., Hadjiakhoondi A.* Comparison of Antioxidant Activity and Total Phenol Contents of some Date Seed Varieties from Iran // Iranian journal of pharmaceutical research. 2010. V. 9. № 2. P. 141-146.
151. *Liu X., Ardo S., Bunning M., Parry J., Zhou K., Stushnoff C., Stoniker F., Yu L., Kendall P.* Total phenolic content and DPPH radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado // LWT - Food Science and Technology. 2007. V. 40. P. 552-557.
152. *Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M.* Screening of 70 medicinal Plant extracts for antioxidant capacity and total phenols // Food Chemistry. 2006. V. 94. P. 550-557.
153. *Vidal-Casanella O., Núñez O., Granados M., Saurina J., Sentellas S.* Analytical Methods for Exploring Nutraceuticals Based on Phenolic Acids and Polyphenols // Applied Sciences. 2021. V. 11. № 18. P. 8276.
154. *Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // Free radical biology & medicine. 1999. V. 26. № 9-10. P. 1231-1237.
155. *Babbar N., Oberoi H., Uppal D., Patil R.* Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from 6 important fruit residues // Food Research International. 2011. V. 44. P. 391-396.
156. *Chen G.-L., Chen S.-G., Zhao Y.-Y., Luo C.-X., Li J., Gao Y.-Q.* Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion // Industrial Crops and Products. 2014. V. 57. P. 150-157.
157. *Magalhães L.M., Segundo M.A., Reis S., Lima J.L.* Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties // Analytica Chimica Acta. 2008. V. 613. № 1. P. 1-19.

158. *Everette J.D., Bryant Q.M., Green A.M., Abbey Y.A., Wangila G.W., Walker R.B.* Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent // Journal of agricultural and food chemistry. 2010. V. 58. № 14. P. 8139-8144.
159. *Ariffin F., Abdullah A., Ariffin S., Chan K.M.* Antioxidant activity of red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Kappaphycus striatum* // International Food Research Journal. 2015. V. 22. P. 1977-1984.
160. *Horie H., Kohata K.* Application of capillary electrophoresis to tea quality estimation // Journal of Chromatography A. 1998. V. 802. № 1. P. 219-223.
161. *Sousa W., Rocha C., Cardoso C., Silva D.H., Zanoni M.* Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods // Journal of Food Composition and Analysis. 2004. V. 17. P. 619-633.
162. *Oliveira-Neto J.R., Rezende S.G., De Fátima Reis C., Benjamin S.R., Rocha M.L., De Souza Gil E.* Electrochemical behavior and determination of major phenolic antioxidants in selected coffee samples // Food Chem. 2016. V. 190. P. 506-512.
163. *Aguirre M.J., Chen Y.Y., Isaacs M., Matsuhiro B., Mendoza L., Torres S.* Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry // Food Chemistry. 2010. V. 121. № 1. P. 44-48.
164. *Blasco A.J., González M.a.C., Escarpa A.* Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants // Analytica Chimica Acta. 2004. V. 511. № 1. P. 71-81.
165. *Sousa W.R., Da Rocha C., Cardoso C.L., Silva D.H.S., Zanoni M.V.B.* Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods // Journal of food composition and analysis. 2004. V. 17. № 5. P. 619-633.
166. *Pedrosa M.M., Muzquiz M., García-Vallejo C., Burbano C., Cuadrado C., Ayet G., Robredo L.M.* Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000. V. 80. № 4. P. 459-464.
167. *De Leonardis A., Macciola V., Di Domenico N.* A first pilot study to produce a food antioxidant from sunflower seed shells (*Helianthus annuus*) // European journal of lipid science and technology. 2005. V. 107. № 4. P. 220-227.

168. Žilić S., Maksimović V., Maksimovic M., Maksimović M., Basić Z., Crevar M., Stankovic G. The content of antioxidants in sunflower seed and kernel // Helia. 2014. V. 52. P. 75-84.
169. Marks S., Mullen W., Crozier A. Flavonoid and chlorogenic acid profiles of English cider apples // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2007. V. 87.
170. Schieber A., Ullrich W., Carle R. Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection // Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2000. V. 1. № 2. P. 161-166.
171. De La Torre-Carbot K., Jauregui O., Gimeno E., Castellote A.I., Lamuela-Raventós R.M., López-Sabater M.C. Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS // Journal of agricultural and food chemistry. 2005. V. 53. № 11. P. 4331-4340.
172. Rohman A., Windarsih A., Lukitaningsih E., Rafi M., Betania K., Ahmad Fadzillah N. The use of FTIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of biomolecules in biomedical fluids: A review // Biomedical Spectroscopy and Imaging. 2020. V. 8. P. 1-17.
173. Lu X., Rasco B.A. Determination of antioxidant content and antioxidant activity in foods using infrared spectroscopy and chemometrics: a review // Crit Rev Food Sci Nutr. 2012. V. 52. № 10. P. 853-875.
174. Vershinina Y., Reshetnikova E., Lv S., Kolesnik I., Kapitanova O., Veselova I. Raman and IR spectroscopy as a promising approach to rapid and non-destructive monitoring of chlorogenic acid in protein matrices // Frontiers in Chemistry. 2025. V. 13.
175. Pissard A., Fernández Pierna J.A., Baeten V., Sinnaeve G., Lognay G., Mouteau A., Dupont P., Rondia A., Lateur M. Non-destructive measurement of vitamin C, total polyphenol and sugar content in apples using near-infrared spectroscopy // J Sci Food Agric. 2013. V. 93. № 2. P. 238-244.
176. Szuvandzsiev P., Prof. Dr.Helyes L., Lugasi A., Szanto C., Baranowski P., Pék Z. Estimation of antioxidant components of tomato using VIS-NIR reflectance data by handheld portable spectrometer. 2013. V. 28. № 4.
177. Gajdoš Kljusurić J., Mihalev K., Bečić I., Polović I., Georgieva M., Djaković S., Kurtanjek Z. Near-Infrared Spectroscopic Analysis of Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Berry Fruits // Food Technology and Biotechnology. 2016. V. 54.

178. *Li X., Sun C., Luo L., He Y.* Determination of tea polyphenols content by infrared spectroscopy coupled with iPLS and random frog techniques // Computers and Electronics in Agriculture. 2015. V. 112.
179. *Wulandari L., Retnaningtyas Y., Nuri, Lukman H.* Analysis of Flavonoid in Medicinal Plant Extract Using Infrared Spectroscopy and Chemometrics // Journal of analytical methods in chemistry. 2016. P. 4696803.
180. *Bunaciu A.A., Aboul-Enein H., Fleschin S., Sa S.* FTIR Spectrophotometric Methods Used for Antioxidant Activity Assay in Medicinal Plants // Applied Spectroscopy Reviews. 2012. V. 47.
181. *Shiroma-Kian C., Tay D., Manrique I., Giusti M.M., Rodriguez-Saona L.E.* Improving the screening process for the selection of potato breeding lines with enhanced polyphenolics content // Journal of agricultural and food chemistry. 2008. V. 56. № 21. P. 9835-9842.
182. *Do Nascimento G.* Introductory Chapter: The Multiple Applications of Raman Spectroscopy. 2018.
183. *Eravuchira P.J., El-Abassy R.M., Deshpande S., Matei M.F., Mishra S., Tandon P., Kuhnert N., Materny A.* Raman spectroscopic characterization of different regioisomers of monoacyl and diacyl chlorogenic acid // Vibrational Spectroscopy. 2012. V. 61. P. 10-16.
184. *Liu E., Han L., Fan X., Yang Z., Jia Z., Shi S., Huang Y., Cai L., Yuan X.* New rapid detection method of total chlorogenic acids in plants using SERS based on reusable Cu(2)O-Ag substrate // Talanta. 2022. V. 247. P. 123552.
185. *Yosri N., Gao S., Zhou R., Wang C., Zou X., El-Seedi H.R., Guo Z.* Innovative quantum dots-based SERS for ultrasensitive reporting of contaminants in food: Fundamental concepts and practical implementations // Food Chemistry. 2025. V. 467. P. 142395.
186. *Maiti N., Kapoor S., Mukherjee T.* Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) Spectroscopy For Trace Level Detection Of Chlorogenic Acid // Advanced Materials Letters. 2013. V. 4. P. 502-506.
187. *Jung S., Rickert D.A., Deak N.A., Aldin E., Recknor J., Johnson L., Murphy P.A.* Comparison of Kjeldahl and Dumas Methods for Determining Protein Contents of Soybean Products // Journal of the American Oil Chemists' Society. 2003. V. 80. P. 1169-1173.

188. *Mariotti F., Tomé D., Mirand P.P.* Converting nitrogen into protein--beyond 6.25 and Jones' factors // Crit Rev Food Sci Nutr. 2008. V. 48. № 2. P. 177-184.
189. *Itzhaki R.F., Gill D.M.* A micro-Biuret method for estimating proteins // Analytical biochemistry. 1964. V. 9. P. 401-410.
190. *Boctor F.N.* Hematin interference with lowry protein determination // Analytical biochemistry. 1972. V. 50. № 2. P. 500-502.
191. *Kazimirova K.O., Shtykov S.N.* Adsorption and Preconcentration of Anionic Azo Dyes on Nanomagnetite Modified with Cationic Polyelectrolytes // Journal of Analytical Chemistry. 2024. V. 79. № 12. P. 1724-1732.
192. *Zhang R., Su P., Yang Y.* Microwave-assisted preparation of magnetic nanoparticles modified with graphene oxide for the extraction and analysis of phenolic compounds // Journal of Separation Science. 2014. V. 37. № 22. P. 3339-3346.
193. *Leopold N., Lendl B.* A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride // The Journal of Physical Chemistry B. 2003. V. 107. № 24. P. 5723-5727.
194. *Esmonde-White K., Mandair G., Raaii F., Roessler B., Morris M.* Raman spectroscopy of dried synovial fluid droplets as a rapid diagnostic for knee joint damage - art. no. 68530Y // Progress in Biomedical Optics and Imaging. 2008. V. 6853.
195. *Lin V.J., Koenig J.L.* Raman studies of bovine serum albumin // Biopolymers. 1976. V. 15. № 1. P. 203-218.
196. *Ramakrishna Matte H.S.S., Subrahmanyam K.S., Venkata Rao K., George S.J., Rao C.N.R.* Quenching of fluorescence of aromatic molecules by graphene due to electron transfer // Chemical Physics Letters. 2011. V. 506. № 4. P. 260-264.
197. *Xie L., Ling X., Fang Y., Zhang J., Liu Z.* Graphene as a substrate to suppress fluorescence in resonance Raman spectroscopy // Journal of the American Chemical Society. 2009. V. 131. № 29. P. 9890-9891.
198. *S.Rao, D. Mohana, S. Adimurthy.* Chitosan: an efficient recyclable catalyst for transamidation of carboxamides with amines under neat conditions // Green Chemistry. 2014. V. 16. P. 4122-4126.