

Development of technology of obtaining dye-based blood Gadimova N.¹, Akhundova N.² (Republic of Azerbaijan)

Разработка технологии получения красителя на основе крови Гадимова Н. С.¹, Ахундова Н. А.² (Азербайджанская Республика)

¹Гадимова Натаван Сафар кызы / Gadimova Natavan - кандидат технических наук, доцент;

²Ахундова Назила Абдул кызы / Akhundova Nazila - кандидат биологических наук, доцент,

кафедра технологий пищевых продуктов,

Азербайджанский государственный экономический университет, г. Баку. Азербайджанская Республика

Аннотация: статья посвящена получению препарата очищенного гемоглобина для окраски колбасных изделий вместо нитрита натрия. Гемоглобин получается путем гемолиза форменных элементов крови водой в соотношении 1:(1-3,5) и доведения pH гемолизата до 5,2-5,4 1 М раствором фосфорной кислоты с последующим центрифугированием. Чистота гемоглобина составила 94-98 %.

Abstract: the article deals with obtaining of the preparation of refined haemoglobin for the improvement of coloration of sausage products. Haemoglobin is obtained through hamoglobyse of formal elements of blood with water in the correlation 1:(1-3,5) and bringing pH haemolizate to 5,2-5,4 1 M solution of phosphoric acid into conformity with the pollowing centrifuging. The article considers the physical-chemikal indications of refined haemoglobin shown.

Ключевые слова: гемоглобин, стабилизация, очистка, фракционный состав, плазма, центрифугирование, фракция, гемолиз.

Keywords: hemoglobin, stabilization, roughage, fractional composition, plasma, centrifugation, fraction, haemolysis.

Важным показателем качества мясопродуктов является их окраска, так как она влияет на выбор покупателя и косвенно говорит о свежести и доброкачественности продукции. Поэтому производство продукции с привлекательными для потребителя характеристиками является важной задачей.

Цветоформирующими веществами в колбасных изделиях являются пигменты миоглобин и гемоглобин, при недостатках которых в фарше наблюдается потеря интенсивности окраски, для чего используют синтетические красители. В мясной промышленности имеется обширный источник естественных пигментов, это форменные элементы (ФЭ) крови убойных животных [2, с. 73].

В качестве исходного сырья для получения источника красящих пигментов использовали пищевую кровь крупного рогатого и мелкого рогатого скота. Для предотвращения свертывания крови до начала переработки проводили стабилизацию ее путем введения в состав стабилизирующих веществ.

В наших исследованиях использовали метод центрифугирования, чтобы удалить жидкую плазму и получить водный раствор сухих веществ гемоглобина, называемых в практике влажными веществами пигмента. Жидкая плазма содержала примерно 9,8 % сухих веществ, а сухие вещества пигмента около 35-36 %. Сухие вещества пигмента - это своего рода свободная комбинация воды и гемоглобина в связанной форме. Когда в гемоглобино-водном комплексе, количество влаги составляет 12-15 %, то его свойства наиболее стабильны.

Обработанную антикоагулянтную кровь пропускали через центрифугу, чтобы отделить плазму, содержащую почти все количество добавленного антикоагулянта, от красных кровяных тел. При разделении получали примерно 2 части плазмы (по объему) и 1 часть красных кровяных телец. Последняя фракция представляла собой вязкую пурпурно-красную жидкость. Процесс центрифугирования проводили в течение 10 минут при скорости вращения ротора центрифуги - 2000 об./мин., после чего плазму сливали. Затем в фугат добавляли примерно равное количество физраствора и операцию повторяли еще 3-4 раза до получения надосадочной жидкости от соломенно-желтого до желто-оранжевого цвета. Полученную плазму сливали, форменные элементы подвергали гемолизу.

Для проведения гемолиза предварительно охлаждали дистиллированную воду до температуры 2-5⁰С и затем форменные элементы смешивали с водой в соотношении от 1:1,0 до 1:3,5; смесь тщательно перемешивали и выдерживали в течение 0,5-1,0 часа. После этого отработывали оптимальные условия для максимального выхода гемоглобина. Результаты опытов контролировали по сухому остатку, сырому протеину и гемоглобину. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1. Соотношение композиций после гемолиза ($x \pm S_x; n=5; p < 0,05$)

Показатели	Соотношение форменных элементов и воды					
	1:1,0	1:1,5	1:2,0	1:2,5	1:3,0	1:3,5

Сухой остаток, %	14,5±0,38	12,6±0,20	9,5±0,18	8,0±0,25	5,5±0,15	2,2±0,03
Сухой протеин, %	11,5±0,34	10,5±0,30	8,5±0,25	7,3±0,20	5,1±0,05	2,05±0,03
Гемоглобин, %	8,5±0,25	8,0±0,22	7,3±0,20	6,5±0,18	4,6±0,13	1,85±0,05

Следовало ожидать, что количество выхода пигмента гемоглобина в пробах будет различным в виду различия степени оводнения (поверхностной энергии) и гемолиза кровяных шариков.

Это предположение подтверждают данные таблицы 1, где видно, что относительные величины освободившегося гемоглобина не одинаковы и максимум приходится на соотношение 1:1,25 (вода-форменные элементы).

Как видно при соотношении форменных элементов и воды 1:1,0 и 1:1,5 гемолиз происходит в недостаточной степени, о чем свидетельствуют показатели удельного веса гемоглобина в общем содержании сырого протеина (73,9 и 76,2 %). При соотношении форменных элементов и воды 1:2,0 и 1:2,5 значительно повышается удельный вес гемоглобина в общей массе сырого протеина соответственно до 85,8 и 89,0 %. При увеличении соотношения форменных элементов и воды до 1:3,0 и 1:3,5 продолжается рост удельного веса гемоглобина, но в то же время значительное разведение форменных элементов нежелательно, так как это увеличивает рабочие объемы гемолизата, что удлиняет технологический процесс и снижает его эффективность. Поэтому наиболее оптимальным являются соотношение форменных элементов и воды 1:2,0 до 1:2,5.

Для очистки гемоглобина отделяли балластные вещества гемолизата при помощи обработки его 1 М раствором фосфорной кислоты. Добавление водного раствора фосфорной кислоты (восстановителя) обеспечивало также ингибирующее действие на окисление, т.е. предотвращало образование коричневого цвета и обеспечивало превращение метмиоглобина и оксигемоглобина в гемоглобин.

Представлялось также важным определить влияние рН на стабильность гемолизатов, т.к., известно, что с введением щелочных растворов происходит быстрое превращение восстановленного гемоглобина в нитрозогемоглобин даже при комнатной температуре и слегка кислой среде.

С целью определения оптимальных значений рН при разделении эритроцитарной стромы и балластных веществ, в гемолизатах испытывали различные значения рН от 4,6 до 6,0. Результаты опыта контролировали по уровню общего белка и гемоглобина в растворе, прозрачности его. Для получения осадка требуемой консистенции испытывали различные режимы центрифугирования - от 2500 до 3500 об./мин.

Результаты опыта представлены на рис. 1 и 2.

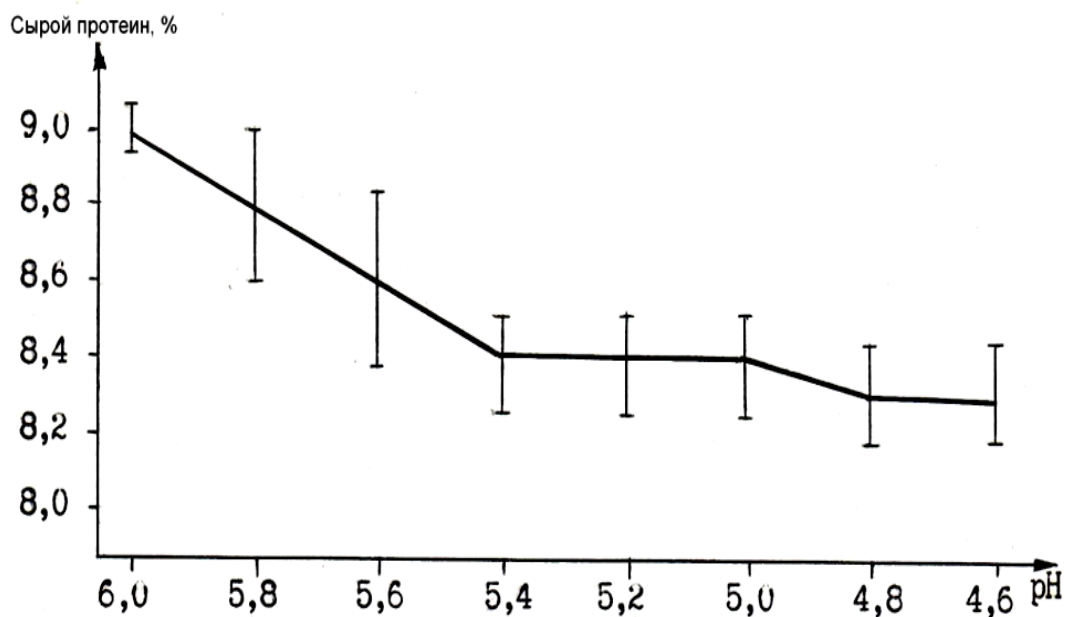


Рис. 1. Изменение уровня сырого протеина в гемолизате в зависимости от рН

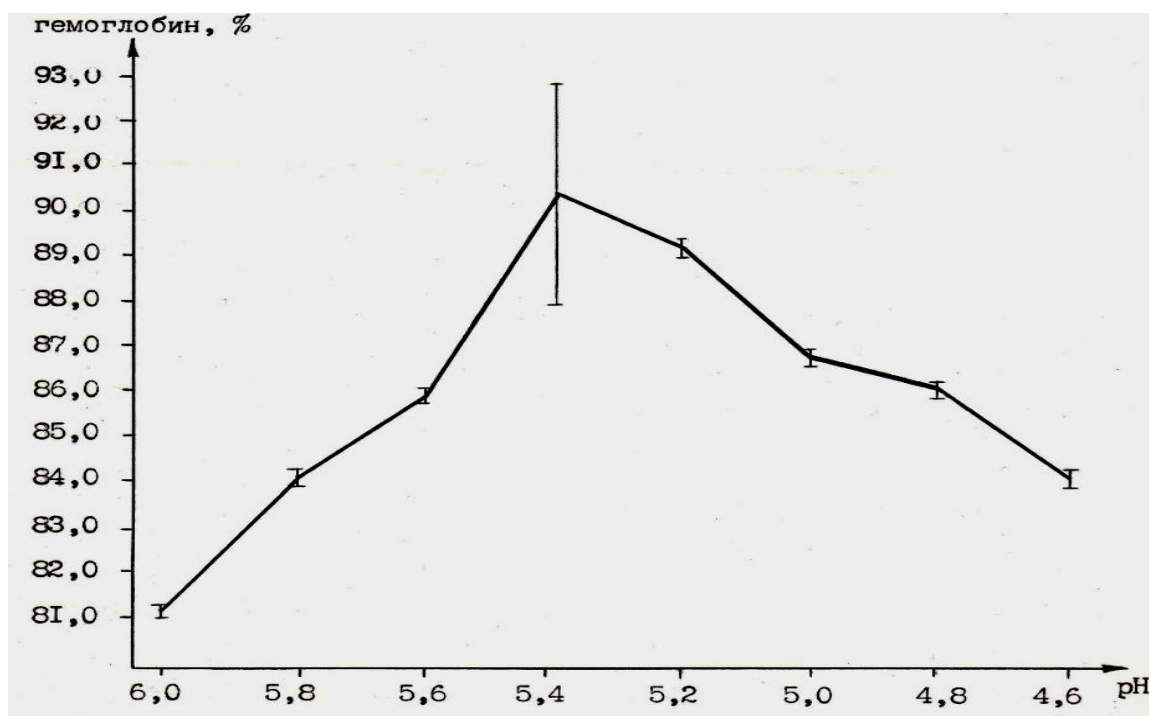


Рис. 2. Изменение уровня гемоглобина в гемоллизате в зависимости от pH

Результаты измерений на рисунках максимальных значений по ординатам соответствуют величинам уровней сырого протеина и гемоглобина, полученным при скорости вращения – 3 500 об./мин, а низшие при скорости – 2 500 об./мин. Значения первых соответствуют усредненным значениям измерений, обработанных статистическим методом.

Согласно общих положений следовало ожидать, что умеренная кислотность среды будет благотворно влиять на выход гемоглобина. Это в первую очередь связано с активной деятельностью ферментов (для крови их наибольшая активность при pH=5, а для мышечных тканей при pH=7). При низших, же значениях pH следует ожидать их инактивацию окислением. Эти положения подтверждают экспериментальные данные, представленные на рис. 1 и 2.

Как видно наиболее значительная концентрация гемоглобина, при стабильно снизившемся уровне общего белка в гемоллизате достигается при значении величин pH 5,2-5,4. Следует отметить, что при этом раствор был прозрачным.

При значениях pH выше 5,4 наблюдается снижение выхода гемоглобина, что, очевидно, связано с недостаточной ферментацией и последующим процессом осаждения.

Центрифугирование гемоллизата при 3 000 об./мин. в течение 15-20 минут обеспечивает устойчивую прозрачность раствора, при этом осадок имеет плотную консистенцию, граница раздела фаз резко выражена. Однако использовать центрифуги с количеством оборотов 3 500 об./мин. нецелесообразно, т.к. они требуют особых условий выравнивания масс в бюксах и т.д.

Использование pH среды при значениях 5,6+6,0 не обеспечивало значительного выхода гемоглобина. Таким образом условия среды и физическое воздействие не способствует процессу получения гемоглобина, а образующийся при этом осадок имеет «слизеподобную» структуру при обоих режимах центрифугирования (2 500 и 3 500 об./мин.)

По разработанному способу было получено три серии гемоглобина, в которых определяли сухой остаток, содержащий гемоглобин, чистоту его и фракционный состав.

Установлено, что в полученных продуктах относительное содержание гемоглобина в сухом остатке составляет не менее 90 %, концентрация гемоглобина в растворе находится в пределах 4,5-5,0 %. Чистота гемоглобина при зональном электрофорезе на пластинах составила 94-98 %.

Результаты изучения фракционного состава полученных серий гемоглобина представлены в таблице 2.

Таблица 2. Фракционный состав препарата гемоглобина

Фракции гемоглобина	Серия 1	Серия 2	Серия 3

	Мол. мас.	Отн. %	Мол. мас.	Отн. %	Мол. мас.	Отн. %
1.	100000	2,42	100000	2,89	100000	1,36
2.	66000	97,58	66000	97,11	66000	96,27
3.	-	-	-	-	8600	2,37

Как видно из таблицы, высокомолекулярная фракция с М.м от 100000 и выше составляет 1,36-2,89 %. Только в серии № 3 обнаружена низкомолекулярная фракция, составляющая 2,37 %. Основная фракция, соответствующая по М.м. гемоглобину, составляет 96,27-97,58 %, что говорит о достаточно высокой чистоте полученного препарата.

Подбор компонентов для создания комплексного красителя проводили среди традиционно используемых или же достаточно известных рецептурных ингредиентов, учитывая при этом перспективность их использования для различных изделий из мясопродуктов. В этих целях перспективным, на основе наших поисковых экспериментов, является использование системы из аскорбиновой кислоты, пищевых фосфатов, а также чебрецового эфирного масла.

При подборе оптимальной дозы нитрита натрия ориентировались на его минимальное количество, необходимое для развития требуемых специфических органолептических свойств в мясных изделиях. Исходя из этого, в экспериментах использовали различные дозы нитрита натрия - от 3,0 до 1,2 мг % вместо традиционно применяемых 7,5 мг % [1, с. 122].

Для обеспечения максимального восстановления красящих пигментов до их оксиформ, а также развития требуемых антиокислительных свойств, количественное содержание выбранных дополнительных ингредиентов в составе красителя определялось, исходя из максимального уровня их в мясопродуктах, допускаемого действующими регламентами – то есть аскорбиновая кислота в количестве 0,05 %, пищевые фосфаты – 0,5 %.

На первых этапах исследований по конструированию комплексного красителя отработывали последовательность внесения в раствор гемоглобина отдельных компонентов (пищевые фосфаты, аскорбиновая кислота, чебрецовое эфирное масло) для обеспечения требуемых свойств красителя. При этом было испытано 6 вариантов опыта, которые оценивали по цвету, интенсивности окраски и консистенции раствора. В каждом варианте опытов к 100 мл 4,5-5,0 % -ного раствора гемоглобина добавляли компоненты в следующих количествах: пищевые фосфаты- 10 г (в виде 50 % раствора), аскорбиновая кислота-10 г, чебрецовое эфирное масло-0,2 г.

Для определения наилучшей композиции конструирования состава красителя из составляющих была принята математическая модель рекомбинаций в шести сочетаниях различной последовательности введения компонентов. Очередность введения представлена в таблице 3.

Таблица 3. Окрашивающие свойства красителя в зависимости от последовательности добавления компонентов

Варианты опыта	Цвет	Интенсивность окраски $\lambda=540$ нм E	Консистенция раствора
1. Гемоглобин+фосфаты+аскорбиновая кислота+чебрецовое эфирное масло	ярко-красный	0,88	жидкий
2. Гемоглобин+фосфаты+ чебрецовое эфирное масло+аскорбиновая кислота	ярко-красный	0,88	жидкий
3. Гемоглобин+аскорбиновая кислота+фосфаты+чебрецовое эфирное масло	коричневый	0,58	вязкий, наличие сгустков
4. Гемоглобин+аскорбиновая кислота+ чебрецовое эфирное масло +фосфаты	коричневый	0,58	вязкий, наличие сгустков
5. Гемоглобин+ чебрецовое эфирное масло + фосфаты+ аскорбиновая кислота	красный	0,88	жидкий
6. Гемоглобин+ чебрецовое эфирное масло+аскорбиновая кислота+фосфаты	красный	0,88	жидкий, наличие хлопьев

В результате установлено, что наиболее оптимальными вариантами опыта являются 1,2 и 5, обеспечивающие необходимый цвет в консистенцию раствора красителя. Первый вариант опыта, предусматривающий последовательное добавление к гемоглобину пищевых фосфатов, аскорбиновой кислоты и чебрецового эфирного масла - был использован нами в дальнейших исследованиях.

Для создания комплексного красителя с оптимальными параметрами во второй серии исследований были использованы 5 вариантов композиций красителя с различным содержанием трех компонентов в следующей последовательности: гемоглобин - пищевые фосфаты -аскорбиновая кислота. При этом гемоглобин использовали в виде 4,5-5,0 % раствора, пищевые фосфаты в виде 5 % раствора, аскорбиновая кислота в нативном виде.

Результаты опыта контролировали по цвету, интенсивности окраски полученного красителя спектрофотометрически, величине рН (результаты измерений представлены в таблице 4).

Таблица 4. Свойства комплексного красителя в зависимости от соотношения различных его компонентов

Варианты опыта	Соотношение гемоглобина и его компонентов	Цвет	Интенсивность окраски, E $\lambda=540$ нм	рН
1.	8-12:30:10	темно-красный	0,40	4,9
2.	8-12:50:9	красный	0,64	5,2
3.	8-12:70:8	ярко-красный	0,80	5,3
4.	8-12:85:7,5	красный	0,88	5,4
5.	8-12:100:6,5	красный	0,86	5,5

Анализ полученных данных и технологическая апробация показали, что наиболее оптимальное сочетание компонентов полученных в вариантах 3, 4 и 5, в которых наблюдали более интенсивную окраску и повышенные значения рН.

Для определения оптимальных значений чебрецового эфирного масла в составе комплексного красителя испытывали различные его концентрации (от 0,05 до 0,25 вес. частей) при установленной оптимальной последовательности введения компонентов – гемоглобин + пищевые фосфаты + аскорбиновая кислота + чебрецовое эфирное масло. Соотношение гемоглобина, пищевых фосфатов и аскорбиновой кислоты было постоянным и составляло соответственно 8-12:80:8,0.

Таким образом, было приготовлено 5 вариантов комплексного красителя, в которых определяли цвет, интенсивность окраски (спектрофотометрически) и рН. Результаты исследований представлены в таблице 5.

Таблица 5. Свойства комплексного красителя в зависимости от соотношения различных компонентов

Варианты опыта	Соотношение- гемоглобин: фосфаты: аскорбиновая кислота: чебрецовое эфирное масло	Цвет	Интенсивность окраски, E $\lambda=540$ нм	рН
1.	8-12:80:8:0,05	красный	0,80	5,4
2.	8-12:80:8:0,1	красный	0,82	5,4
3.	8-12:80:8:0,15	ярко-красный	0,84	5,4
4.	8-12:80:8:0,2	ярко-красный	0,88	5,4
5.	8-12:80:8:0,25	ярко-красный	0,96	5,4

Как видно из таблицы, все варианты красителя имели красный и ярко-красный цвет, при довольно высокой интенсивности окраски. Испытанные концентрации чебрецового эфирного масла не влияли на показатели рН.

Разработанный нами краситель может быть использован для окраски колбасных изделий взамен нитрита натрия.

Литература

1. Глазкова И. В. *Натуральные красители для мясной промышленности* [Текст] / И. В. Глазкова, В. А. Сидорова // Сб. тез. 2-го Московск. международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2003. – С. 122.
2. Щепилова Е. М., Добрынина А. Н., Антипова Л. В., Пешков А. С. *Использование крови при производстве колбасных изделий*. Материалы конференции «Современные наукоемкие технологии», № 3, 2010.