

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-2-2633>
<https://elibrary.ru/YLIPNL>

Оригинальная статья
<https://fptt.ru>

Оптимизация щелочной экстракции и изоэлектрического осаждения белка конопли для использования в пищевой промышленности



Д. И. Алексаночкин^{1,*}, И. А. Фоменко¹, И. А. Детинкин¹,
И. М. Чернуха^{1,2}, Н. Г. Машенцева¹

¹ Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия

² Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию: 24.09.2025

Принята после рецензирования: 25.11.2025

Принята к публикации: 10.03.2026

*e-mail: aleksanochkindi@list.ru

© Д. И. Алексаночкин, И. А. Фоменко, И. А. Детинкин,
И. М. Чернуха, Н. Г. Машенцева, 2026



Аннотация.

Растущий интерес к растительным белкам как к экологичной и эффективной альтернативе животным белкам обусловил появление новых продуктов на рынке, в т. ч. изолята белка конопли. Ключевым этапом в технологии получения белковых препаратов из растительного сырья является щелочная экстракция (pH 6,0–12,0) с последующим изоэлектрическим осаждением. Цель исследования – изучить влияние параметров экстракции и изоэлектрического осаждения (с расчетом теоретической и экспериментальной изоэлектрической точки) на выход белка из гидролизованного жмыха конопли и определить условия максимизации.

Объект исследования – жмых конопли сорта Вера. Для оптимизации параметров экстракции (pH, температура, продолжительность) был использован трехфакторный план Бокса-Бенкена (15 экспериментальных точек).

Установлено, что добавление хлорида натрия снижает эффективность экстракции на 6,8–13,5 % по сравнению с щелочным методом. Оптимальная чистота белка (92,6–93,1 %) достигается при изоэлектрическом осаждении в диапазоне pH 4,4–4,6, что не соответствует теоретической изоэлектрической точке (6,95–7,22). Анализ белкового профиля выделенной фракции выявил преобладание эдестина (~ 38 кДа) и альбумина (~ 21 кДа). Полученный изолят белка конопли содержит от 89,53 до 92,28 % белка (по методу Барнштейна и Кьельдаля соответственно), что свидетельствует о высоком качестве продукта. Регрессионная модель адекватно описывает технологический процесс ($R^2 = 0,983$) с оптимальными условиями экстракции – pH 11,2, температура 52 °C и длительность 3 ч.

Использование щелочного экстрагирования с последующим осаждением белка в его изоэлектрической точке позволяет эффективно выделять белок с выходом до 80 % относительно его количества в сырье, содержащем $34,32 \pm 3,43$ % сырого протеина.

Ключевые слова. Промышленная конопля, экстракция белка, изоэлектрическая точка, изолят белка, оптимизация, математическая модель, степень экстракции, профиль белка конопли, биоинформатика

Финансирование. Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-16-00178).

Для цитирования: Алексаночкин Д. И., Фоменко И. А., Детинкин И. А., Чернуха И. М., Машенцева Н. Г. Оптимизация щелочной экстракции и изоэлектрического осаждения белка конопли для использования в пищевой промышленности. Техника и технология пищевых производств. 2026. Т. 56. № 2. С. 247–259. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-2-2633>

Hemp Protein in the Food Industry: Optimizing Alkaline Extraction and Isoelectric Precipitation



Denis I. Aleksanochkin^{1,*}, Ivan A. Fomenko¹, Ilya A. Detinkin¹,
Irina M. Chernukha^{1,2}, Natalia G. Mashentseva¹

¹ Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia

² V. M. Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of RAS, Moscow, Russia

Received: 24.09.2025

Revised: 25.11.2025

Accepted: 10.03.2026

*e-mail: aleksanochkindi@list.ru

© D.I. Aleksanochkin, I.A. Fomenko, I.A. Detinkin, I.M. Chernukha,
N.G. Mashentseva, 2026



Abstract.

Plant proteins and their products, e.g., hemp protein isolate, offer a sustainable and effective alternative to animal proteins. Protein preparations are obtained from plant materials by alkaline extraction (pH 6.0–12.0) followed by isoelectric precipitation. This article describes the effect of extraction and isoelectric precipitation parameters on protein yield from hydrolyzed hemp cake. Calculating the theoretical and experimental isoelectric point made it possible to improve the procedure and increase the yield. The study featured hemp cake of the Vera variety. A three-factor Box–Behnken design (15 experimental points) optimized the extraction parameters of pH, temperature, and time.

The resulting regression model adequately described the process ($R^2 = 0.983$) with the optimal extraction conditions as pH 11.2; 52°C; 3 h. Sodium chloride reduced extraction efficiency by 6.8–13.5% compared to the alkaline method. The optimal protein purity (92.6–93.1%) was achieved with isoelectric precipitation in the pH range of 4.4–4.6, which did not correspond to the modeled isoelectric point (6.95–7.22). The protein profile analysis of the isolated fraction demonstrated the predominance of edestin (~38 kDa) and albumin (~21 kDa). The resulting hemp protein isolate contained 89.53 to 92.28% protein, according to the Barnstein and Kjeldahl methods, respectively, which indicated a high-quality product.

The use of alkaline extraction followed by protein precipitation in isoelectric point provided efficient protein isolation with a yield reaching 80% relative to its content in the raw material, containing $34.32 \pm 3.43\%$ crude protein.

Keywords. Industrial hemp, protein extraction, isoelectric point, protein isolate, optimization, mathematical model, extraction degree, hemp protein profile, bioinformatics

Funding. The research was supported by the Russian Science Foundation, Project no. 25-16-00178.

For citation: Aleksanochkin DI, Fomenko IA, Detinkin IA, Chernukha IM, Mashentseva NG. Hemp Protein in the Food Industry: Optimizing Alkaline Extraction and Isoelectric Precipitation. Food Processing: Techniques and Technology. 2026;56(2):247–259. (In Russ.) <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2026-2-2633>

Введение

В последнее время внимание к растительным белковым ингредиентам и обогащенным ими продуктам питания заметно возросло вследствие усиления тренда на здоровый образ жизни и распространения вегетарианства [1]. Ожидается, что новые виды растительных белков, получаемые из доступного сырья (например семян) или из побочных продуктов пищевых производств и вторичных сырьевых ресурсов (жмыхов и шротов масличных культур), станут альтернативой белкам животного происхождения. Это связано с более высокой эффективностью их производства, меньшим воздействием на окружающую среду, а также способностью соответствовать диетическим и культурным предпочтениям потребителей [2, 3].

Промышленная конопля – богатый источник микро- и макроэлементов. В составе нативного семени содержится 30 % белка, удаление матрикса позволяет повысить этот показатель [4, 5]. В настоящее время на рынке представлен широкий ассортимент продукции из конопляных семян: цельные и очищенные семена, масло, жмых и шрот (побочные продукты маслоэкстракционного производства, получаемые прессованием и экстракцией соответственно), а также различные белковые препараты [6]. В связи с этим существует значительный потенциал использования продуктов из конопли в различных отраслях пищевой индустрии, поэтому разработка конопляных продуктов с прогнозируемым составом и желаемыми технологическими свойствами является актуальной [7].

Изолят белка конопли представляет собой перспективный продукт, позволяющий в большой мере удовлетворить потребности современного потребителя [8]. Аминокислотный состав белка, согласно опубликованным данным, соответствует рекомендациям ФАО/ВОЗ [9]. На сегодняшний день активно ведутся исследования по изучению и улучшению функционально-технологических и антиоксидантных свойств этого продукта [10, 11]. Тем не менее, многие вопросы остаются недостаточно изученными, что подчеркивает актуальность исследований по получению и изучению белковых продуктов из конопли. На рисунке 1 представлена типовая схема получения изолята белка из растительного сырья.

Щелочная экстракция белка выступает самым распространенным методом выделения белковой фракции из нативной структуры растительного матрикса. Для большинства растительных субстратов этот процесс проводится в широком диапазоне рН от 6,0 до 12,0 с последующим изоэлектрическим осаждением при рН 4,5–5,5. Именно при высоких значениях рН наблюдается максимальная экстракция белковых веществ [12]. рН является ключевым фактором, влияющим на эффективность экстракции белков из конопли. В кислой среде (рН от 2,0 до 7,0) выход экстрагируемых белков остается низким, что в основном обусловлено растворением альбуминов. Интенсивное извлечение глобулинов начинается при рН 8,0 и возрастает с повышением щелочности среды. Максимальный выход белка достигается при сильнощелочных условиях (рН > 9,0) при отсутствии добавления солей, что обосновывает выбор данного

диапазона рН для дальнейшей оптимизации щелочной экстракции [13, 14]. Среди недостатков щелочной экстракции выделяют образование D-форм аминокислот и реакцию Майяра, приводящую к потемнению продукта. В то же время кислотная экстракция обеспечивает щадящее воздействие на аминокислотный состав и формирование белкового изолята с более светлой окраской [15]. Следующий этап в технологии получения изолята растительного белка – изоэлектрическое осаждение. В ходе этого процесса белок теряет свой заряд и выпадает в осадок [16].

Значение изоэлектрической точки (ИЭТ) растительных белков варьируется в диапазоне от 1,99 до 13,96, что охватывает почти весь спектр рН. Преобладают белки с низкой (смещенной в кислую область) ИЭТ, тогда как белки с высокой (смещенной в щелочную область) ИЭТ встречаются реже, а количество белков с ИЭТ, близкой к нейтральной, крайне мало [17]. Белок конопли 11S (гомологичен белкам бобовых) имеет ИЭТ при рН 6,4, в то время как 7S-вицилиноподобный белок характеризуется наименьшей растворимостью при рН 4,6 [18].

Эдестин и альбумин составляют 60–80 % и 20–30 % конопляного белка соответственно [19]. Конопляный глобулин состоит из 11S-эдестина и 7S-глобулина, при этом 11S-эдестин составляет 80 %, 7S-глобулин – 5 % белка конопли [20]. Эдестин – сложный белковый комплекс, представляющий собой гомогексамер с общей молекулярной массой около 300 кДа, аналогичный по структуре 11S-глобулину, характерному для бобовых культур. Он состоит из двух типов субъединиц, соединенных дисульфидными связями: кислой



Рисунок 1. Получение изолята растительного белка (ИЭТ – изоэлектрическая точка)

Figure 1. Plant protein isolate: production protocol (ИЭТ– isoelectric point)

(~ 34 кДа) и щелочной, представленной фракциями с массой приблизительно 18 и 20 кДа. В составе других белковых компонентов выделяется 7S-глобулин, который представлен полипептидом массой 48 кДа. Третья фракция глобулинов включает вицилиноподобный протеин – бета-конглицинин, доля которого составляет около 5 % от общего белкового состава. Водорастворимая фракция альбуминов в основном представлена 2S-альбумином с молекулярной массой около 10 кДа, а также низкомолекулярными белками, масса которых не превышает 35 кДа [21, 22].

Цель исследования – изучить влияние параметров экстракции и изоэлектрического осаждения белка конопли (с расчетом теоретической и экспериментальной ИЭТ) на выход белковой фракции из обезжиренного гидролизованного жмыха и определить условия для его максимизации.

Объекты и методы исследования

Жмых конопли сорта Вера, выращенной в Пензенской области (Россия), был получен шнековым пресованием на малом предприятии по производству масла «ДобрыйЗнакъ.РФ» (Одинцово, Россия). Содержание сырого протеина в конопляном жмыхе составило $34,32 \pm 3,43$ %, сырого жира – $10,90 \pm 1,10$ %, сырой клетчатки – $31,85 \pm 3,19$ %. Измельчение жмыха конопли осуществляли до размера частиц не более 100 мкм, после чего проводили его обезжиривание с использованием органического растворителя н-гексана при соотношении сырья к растворителю 1:6, температуре 40 °С, в течение 2 ч при перемешивании 200 мин⁻¹. Затем смесь центрифугировали 15 мин при 4000 мин⁻¹. Обезжиренный осадок сушили при температуре 50 °С в течение 1,5 ч. Содержание сырого протеина в обезжиренном жмыхе составляло – $37,58 \pm 3,76$ %, сырого жира – $1,42 \pm 0,15$ %, сырой клетчатки – $38,55 \pm 3,86$ %. Далее жмых обрабатывали ферментным препаратом ЦеллоЛюкс А (Сиббиофарм, Россия) с дозировкой 2 % (2000 ед. ЦЛС/г) и временем гидролиза 4 ч. Ферментативная обработка обеспечила степень гидролиза некрахмальных полисахаридов до 35 % и способствовала увеличению содержания белка на 25 %. Полученную суспензию использовали далее.

Таблица 1. Интервалы варьирования независимых факторов

Table 1. Variability intervals of independent factors

Независимые переменные	Обозначение	Закодированное значение		
		-1	0	1
		Натуральное значение		
рН	x_1	10	11	12
Температура, °С	x_2	40	50	60
Время экстракции, ч	x_3	1	2	3

Для определения оптимальных параметров процесса экстракции был применен трехфакторный план Бокса-Бенкена, включающий 15 экспериментальных точек, в сочетании с методологией поверхности отклика (RSM). В качестве независимых переменных выбраны рН (x_1), температура (x_2) и время экстракции (x_3) (табл. 1).

Полученные коэффициенты регрессии считались значимыми при $p < 0,05$. Для анализа экспериментальных данных использовали дисперсионный анализ ANOVA программного обеспечения Statistica 10 (StatSoft Inc., США).

Степень экстракции белка конопли (DE), %, рассчитывали по формуле (1):

$$DE = \frac{C \times V}{\frac{PC}{100} \times m} \times 100 \quad (1)$$

где C – концентрация белка в экстракте, мг/мл; V – объем суспензии, мл; PC – содержание сырого протеина в исследуемом образце, %; m – масса АСВ навески обезжиренного и гидролизованного жмыха конопли, мг.

Определение концентрации белка в экстракте проводили с использованием метода Бредфорда согласно ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка». Определение сырого протеина выполняли по ГОСТ 13496.4-2019. Оценка эффективности экстракции по соотношению растворимого белка к сырому протеину может иметь погрешность: метод Кьельдаля определяет общий азот (включая не только белки), тогда как метод Бредфорда чувствителен к рН, типу белка и калибровочному стандарту.

В качестве экстракции с NaCl использовали концентрации от 0 до 1 моль/л с шагом в 0,2 при оптимальных параметрах экстракции, которые были получены с использованием математической модели.

Вычисление теоретической изоэлектрической точки осуществляли с использованием биоинформатических баз данных UniProt, PepDraw и протеинового калькулятора Isoelectric Point Calculator 2.0 путем анализа суммарного заряда белка.

Экспериментальное осаждение белка в фугате выполняли после экстракции и центрифугирования образца при 4000 мин⁻¹ в течение 15 мин. Осаждение проводили при рН от 2,0 до 6,0 с выдержкой 10 мин при температуре 5 °С с использованием 10 % раствора HCl. Выход белка рассчитывали как отношение разницы между содержанием растворимого белка до и после осаждения к его количеству до осаждения с использованием метода Бредфорда.

Белковый электрофорез в полиакриламидном геле проводили в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, США). При приготовлении гелей использовали реактивы и наборы G2003-50T (Servicebio, Китай). Окраску белка в гелях производили красителем Кумасси R-250. Для опреде-

ления молекулярной массы использовали стандарт смеси белков-маркеров 10–200 кДа – набор G2058-250UL (Servicebio, Китай). Электрофорез проводили по методу Леммли, основанному на разделении белков по их молекулярной массе.

Определение абсолютно сухого вещества осуществляли путем высушивания до постоянной массы по ГОСТ 31640-2012, сырой золы – по ГОСТ 32933-2014, «истинного» белка – по ГОСТ Р 57221-2016 (метод Барнштейна).

Результаты и их обсуждение

На функциональные свойства белка влияют методы и условия экстракции (значение pH, наличие или отсутствие моно- и поливалентных солей, ионная сила среды, используемой для экстракции белка, время и температура). Как правило, методы экстракции, включающие длительные и высокие температурные условия, приводят к образованию белковых изолятов с пониженными питательными свойствами. В щелочной экстракционной среде может произойти ряд нежелательных реакций, таких как рацемизация аминокислот, образование лизиноаланина, снижение усвояемости и потеря незаменимых аминокислот [2, 23]. Таким образом, оптимизация физических параметров экстракции является критически важным этапом для получения высококачественного изолята белка из конопли.

Для определения оптимальных параметров щелочной экстракции белка с учетом температурных условий, значений pH и времени экстракции был построен трехфакторный план Бокса-Бенкина и применена методология поверхности отклика. Результаты 15 экспериментов по экстракции представлены в таблице 2.

Полученная регрессионная модель характеризуется коэффициентом детерминации $R^2 = 0,983$, что

указывает на высокую степень корреляции между факторами и описывается следующим уравнением в кодированной форме (2):

$$DE = -1084,23 + 174,95x_1 + 6,26x_2 - 2,64x_3 - 0,21x_1x_2 + 0,34x_1x_3 + 0,05x_2x_3 - 7,36x_1^2 - 0,04x_2^2 - 0,46x_3^2 \quad (2)$$

где DE – степень экстракции белка, %; x_1 – pH; x_2 – температура, °C; x_3 – время экстракции, ч.

Для определения значимости построенной модели провели анализ ANOVA (табл. 3).

Статистически значимое влияние на степень экстракции белка ($p < 0,05$) оказывали линейные эффекты всех трех факторов (pH, температура, время), квадратичные эффекты pH и температуры, а также их парное взаимодействие. Взаимодействие pH и температуры указывает на то, что их совместное изменение оказывает более выраженное влияние, чем сумма индивидуальных эффектов. Полученные данные позволяют построить математическую модель процесса экстракции, которая может быть использована для прогнозирования выхода белка и выбора оптимальных условий проведения процесса в лабораторных и промышленных масштабах.

На рисунке 2 представлены графики поверхности отклика, отражающие влияние двух независимых факторов на степень экстракции белка.

Поверхности отклика демонстрируют выраженный характер зависимости выхода белка от факторов процесса. Наибольшее влияние оказывает взаимодействие pH и температуры с четким максимумом в области 11,0–11,5 и 50–55 °C, что соответствует форме графика. Влияние времени проявляется слабее с умеренным ростом экстракции до 2,5–3,0 ч. Выход за пределы указанного диапазона pH (выше 11,5) сопро-

Таблица 2. Результаты экспериментов по экстракции белка

Table 2. Protein extraction results

Эксперимент	pH	Температура, °C	Время, ч	Экспериментально полученное значение степени экстракции, %	Предсказанное моделью значение степени экстракции, %
1	10	40	2	36,64	39,34
2	10	50	1	42,73	42,82
3	10	50	3	45,75	44,83
4	10	60	2	45,52	42,55
5	11	60	3	53,71	54,27
6	11	50	2	55,45	55,45
7	11	50	2	55,78	55,45
8	11	50	2	55,11	55,45
9	11	40	1	49,43	47,95
10	11	40	3	51,27	51,06
11	11	60	1	50,02	51,16
12	12	60	2	47,57	49,07
13	12	50	1	49,07	49,33
14	12	50	3	53,21	52,45
15	12	40	2	46,87	45,86

Таблица 3. Анализ ANOVA для квадратичной модели экстракции белка из жмыха конопли

Table 3. Quadratic model of protein extraction from hemp cake (ANOVA)

Параметры	Сумма квадратов	Степень свободы	Среднеквадратичная ошибка	F-значение	p-значение
x_1	85,02	1	85,02	63,40	< 0,05
x_1^2	199,85	1	199,85	149,02	< 0,05
x_2	20,61	1	20,61	15,37	< 0,05
x_2^2	55,65	1	55,65	41,49	< 0,05
x_3	19,41	1	19,41	14,47	< 0,05
x_3^2	0,77	1	0,77	0,58	0,48
x_1x_2	17,68	1	17,68	13,19	< 0,05
x_1x_3	0,46	1	0,46	0,34	0,59
x_2x_3	0,86	1	0,86	0,64	0,46
Ошибка	177,79	5	35,56	–	–
Общая SS	860,23	14	–	–	–

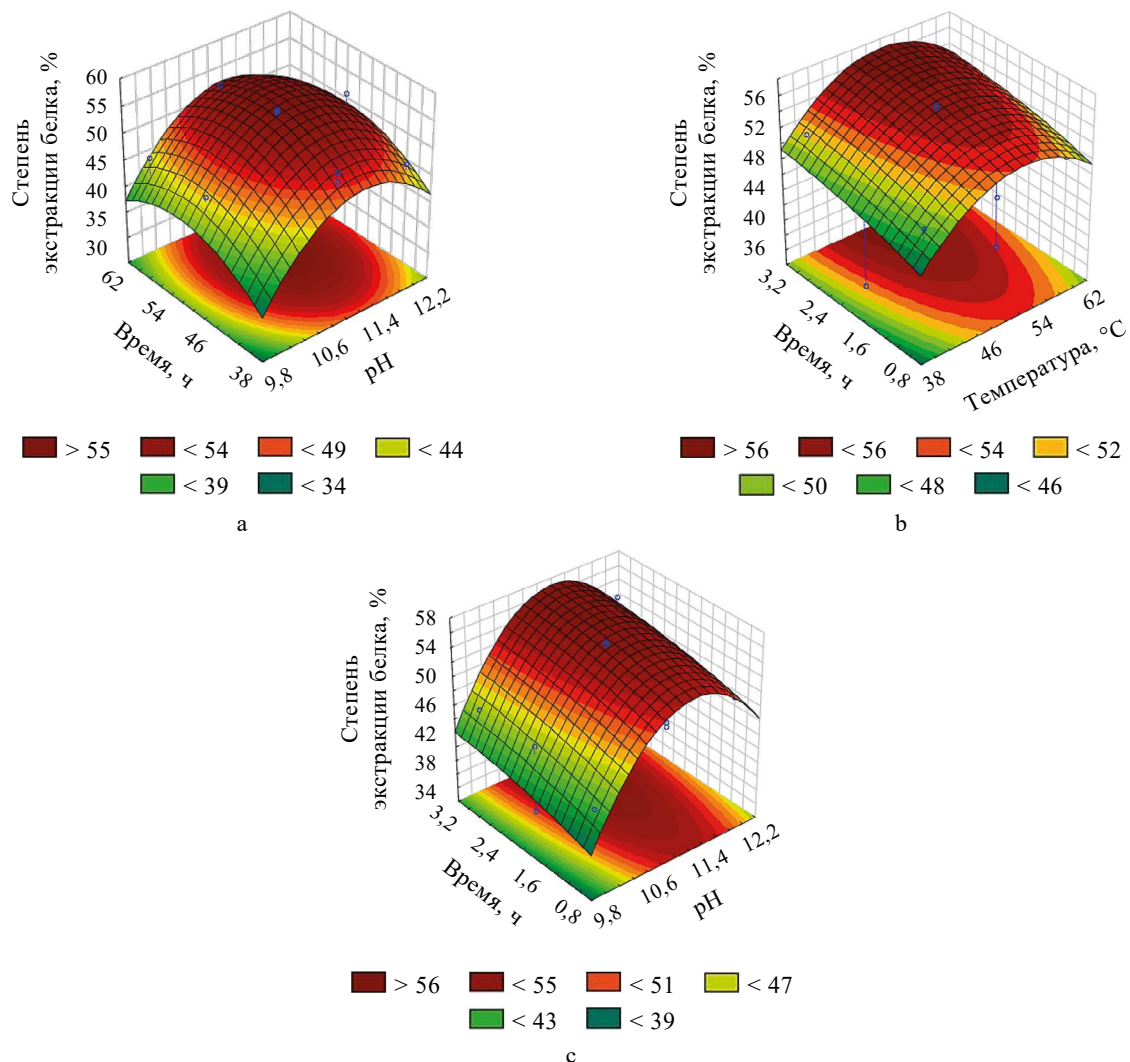


Рисунок 2. Влияние независимых переменных на степень экстракции белка из конопляного жмыха:

a – pH и температура; b – температура и время

Figure 2. Effect of independent variables on protein extraction from hemp cake: a – pH and temperature; b – temperature and time; and c – pH and time

вождается снижением степени экстракции, что может быть связано с денатурацией белков или образованием нерастворимых комплексов. Для температуры также установлен порог выше 55 °С, превышение которого ведет к ухудшению экстракции вследствие термической денатурации белка.

Для рационализации параметров экстракции использовали функцию желательности. За полностью желательный отклик (значение функции 1) была принята степень экстракции 100 %, за полностью неприемлемое значение отклика (значение функции 0) – 0 % (рис. 3).

Результаты моделирования показали, что оптимальные условия экстракции для достижения максимального выхода белка соответствуют рН 11,2, температуре 52 °С и времени экстракции 3 ч. Использование функции желательности позволило определить точку, в которой достигается оптимальный баланс между всеми факторами. При данных параметрах предсказанная степень экстракции белка составила 57,1 %, что было подтверждено экспериментально: в оптимальных условиях достигнута степень экстракции 61,4 %. Таким образом, полученное значение (61,4 %) превышает пороговый уровень 55 %.

Для повышения выхода белка использовали экстракцию с хлоридом натрия (NaCl). Этот подход основан на способности солей изменять ионную силу среды, что способствует дезагрегации белковых струк-

тур и их последующему растворению за счет ослабления гидрофобных взаимодействий и электростатических связей между белками и матрицей субстрата (жмыха конопля) [24]. Комбинация различных концентраций соли и рН используется для селективного растворения или осаждения фракций глобулинов и вицилина при фракционировании белка [1, 25]. На рисунке 4 представлен график влияния концентрации хлорида натрия (0,2–1,0 моль/л) на степень экстракции белка в оптимальных условиях, рассчитанных с использованием математической модели.

По результатам экстракции с применением хлорида натрия установлено, что добавление соли не способствует высокой эффективности извлечения белка по сравнению с контрольным образцом (61,4 %), где использовалась стандартная щелочная экстракция (рН 11,2, время 3 ч, температура 52 °С). При использовании 0,2 моль/л раствора хлорида натрия степень экстракции снижается на 13,5 %. Однако с повышением концентрации соли наблюдается рост степени экстракции. Это можно объяснить эффектом засоления: ионные соединения в определенном диапазоне ионной силы ослабляют электростатические взаимодействия между молекулами белка и способствуют его лучшей гидратации, что в итоге приводит к увеличению растворимости белка [13]. Полученные данные согласуются с результатами работы E. Cabral *et al.*, в которой степень

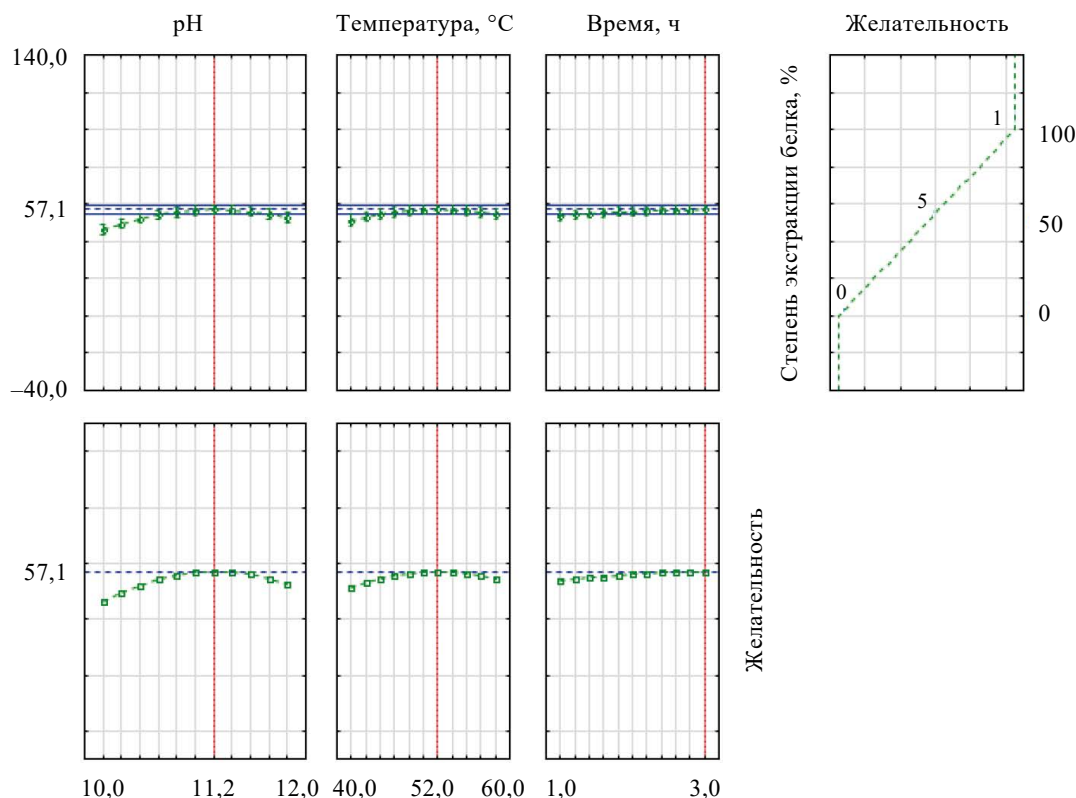


Рисунок 3. Профили предсказанных значений и функции желательности

Figure 3. Modeled values and desirability functions

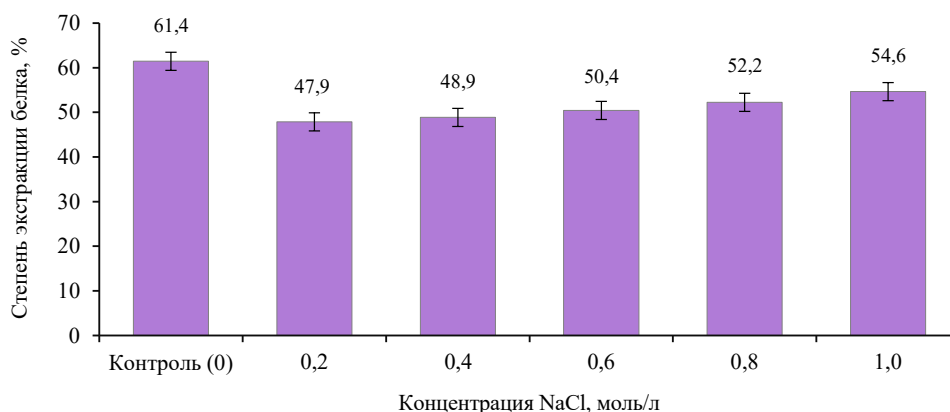


Рисунок 4. Степень экстракции белка с использованием NaCl

Figure 4. Protein extraction with NaCl

Таблица 4. Теоретическая изоэлектрическая точка белка конопли

Table 4. Modeled isoelectric point of hemp protein

Белок	Ген	Номер белка в UniProt	ИЭТ белка в PepDraw	Среднее значение ИЭТ PepDraw
Эдестин	<i>CsEde1D</i>	A0A090CXP5	7,19	7,44
	<i>CsEde2A</i>	A0A090CXP9	7,68	
	<i>CsEde1B</i>	A0A090CXP7	7,17	
	<i>CsEde2B</i>	A0A090DLI7	7,71	
	<i>CsEde2C</i>	A0A090CXP8	7,68	
	<i>CsEde1A</i>	A0A090DLH8	7,19	
2S-альбумин	<i>Cs2S1</i>	A0A219D1L6	5,11	5,11
7S-вицилиноподобный белок	<i>Cs7S</i>	A0A219D1T7	6,97	6,97
Среднее значение ИЭТ для белка конопли			7,09	
Теоретическая ИЭТ PepDraw = $(7,44 \times 75 \% + 5,11 \times 20 \% + 6,97 \times 5 \%) = 6,95$				

Примечание: ИЭТ – изоэлектрическая точка.

Note: ИЭТ – isoelectric point.

экстракции после обработки щелочью без внесения хлорида натрия составляла 60–78 %, при внесении соли 20–48 % [25].

Далее определяли теоретическую изоэлектрическую точку (ИЭТ) растительного белка конопли с использованием биоинформационных баз данных UniProt и PepDraw. Результаты по теоретическому изоэлектрическому осаждению белка представлены в таблице 4.

Теоретическая ИЭТ белка эдестина составляет от 7,19 до 7,68. В базе данных UniProt для 2S-альбумина и 7S-вицилиноподобного белка было идентифицировано только по одному гену, что позволило определить их ИЭТ как 5,11 и 6,97 соответственно. Суммарная ИЭТ белкового комплекса конопли, рассчитанная с учетом относительного содержания его компонентов (по данным научной литературы: эдестин – 75 %; альбумин – 20 %; 7S-вицилиноподобный белок – 5 %), составила 6,95. Также выполнен расчет теоретической ИЭТ с использованием биоинформационного калькулятора Isoelectric Point Calculator 2.0 (рис. 5) [27]. В качестве объекта использовали аминокислотные

последовательности в формате FASTA для 100 белков конопли (отсортированных по номерам в базе данных UniProt).

Предсказание ИЭТ осуществляли на основе уравнения Гендерсона-Хассельбаха для оценки суммарного заряда белка при различных значениях pH с дополнительным применением алгоритмов машинного обучения для повышения точности прогноза [28]. Рисунок 5 визуализирует расположение белков конопли в их ИЭТ (в основном от 4,20 до 10,54). На основе анализа предсказанных значений изоэлектрического осаждения для белков конопли было рассчитано среднее арифметическое значение (исходя из всех значений ИЭТ в программе IPC 2.0), составившее pH 7,22. По данным литературы, теоретические ИЭТ белков конопли были в диапазоне от слабых значений 5,07 до умеренно основных 9,61. При этом более 78 % белков обладали щелочной природой, т. е. их ИЭТ превышала pH 7 [29].

Далее экспериментально определяли ИЭТ белка конопли после щелочной экстракции с оптимальными параметрами экстракции белка (рис. 6).



Рисунок 5. Теоретическая изоэлектрическая точка белка конопли

Figure 5. Modeled isoelectric point of hemp protein

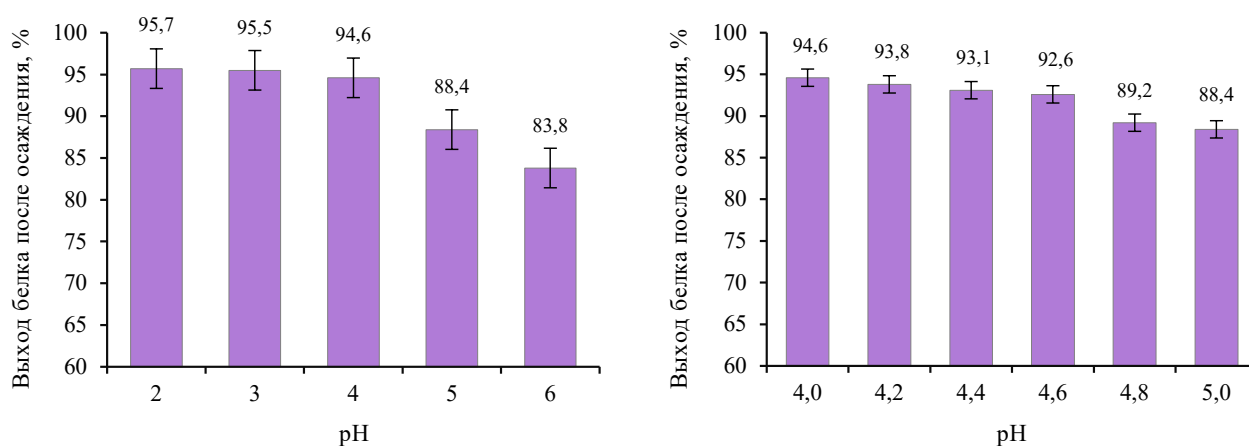


Рисунок 6. Определение изоэлектрической точки белка конопли

Figure 6. Isoelectric point of hemp protein

По результатам экспериментального изоэлектрического осаждения выявлено, что рациональные параметры лежат в диапазоне pH от 4,4 до 4,6, где чистота белка составляет 93,1–92,6 %. ИЭТ белка конопли совпадает с исследованиями зарубежных авторов А. Vanskota *et al.* [8] и S. El-Sohaimy *et al.* [12], в которых pH составлял 4,5–4,6. Однако ИЭТ, определенная экспериментально, отличается от теоретической (pH 6,95–7,22), т. к. биоинформатические модели, основанные на аминокислотной последовательности, не учитывают влияние трехмерной структуры, посттрансляционных модификаций, локальных электростатических взаимодействий и склонности к агрегации – факторов, которые в реальных условиях существенно изменяют группы белков. Для эдестина расчетные значения ИЭТ значительно выше экспериментальных, что нельзя сказать об альбумине, где значения более приближены к экспериментальным. Таким образом, экспериментальная ИЭТ отражает истинное поведение

белка в среде, тогда как теоретическая величина представляет собой упрощенную модель [27, 30].

После определения оптимальных параметров экстракции был проведен электрофорез белковых экстрактов, полученных при обработке 0,4–1,0 М NaCl и при щелочной экстракции в диапазоне pH 9,0–12,0. Результаты электрофореза представлены на рисунке 7.

По данным электрофореза при использовании экстракции с хлоридом натрия обнаружены полосы (1) с молекулярной массой ~ 12 кДа, соответствующие 7 полипептидам в диапазоне 6–35 кДа [31]. Выявлена также полоса (2) с массой ~ 21 кДа, характерная для альбумина. Полоса (3) с молекулярной массой ~ 38 кДа соответствует мономеру эдестина [31, 32]. Кроме того, присутствуют полосы (4) в области 60–70 кДа, выявленные при солевой и щелочной экстракции.

Далее проводили сушку изолята белка при значениях pH экстракции 8–12 в лиофильной сушильной установке ВК-FD10S (Biobase, Китай). Визуализация

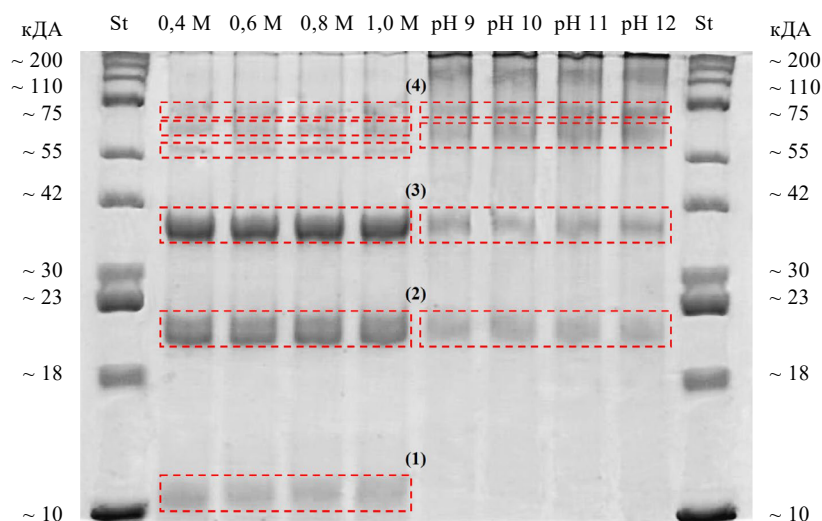


Рисунок 7. Электрофорез экстракта белка из жмыха конопли: St – стандартные маркеры G2058-250UL

Figure 7. Electrophoresis of protein extract from hemp cake: St – standard markers G2058-250UL

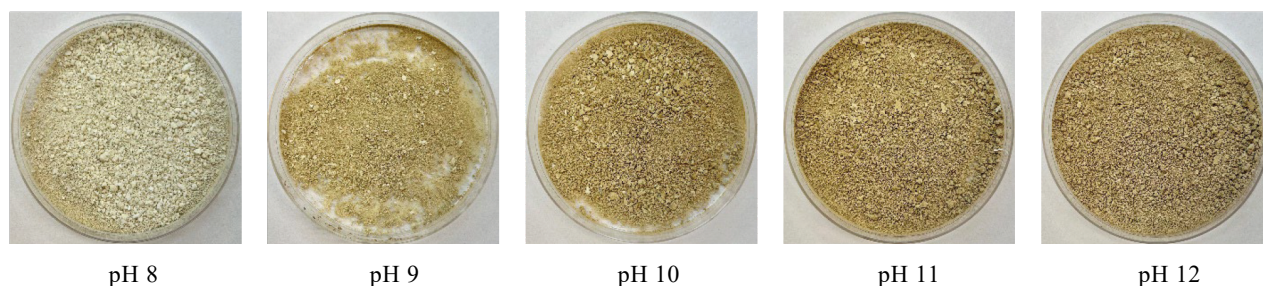


Рисунок 8. Изолят белка конопли после экстракции в диапазоне pH 8–12

Figure 8. Hemp protein isolate after extraction at pH 8–12

Таблица 5. Биохимический состав готового продукта

Table 5. Biochemical composition of the finished product

Абсолютно сухое вещество, %	Содержание сырого протеина, %	Содержание «истинного» белка, %	Содержание сырой золы, %
96,68 ± 4,83	92,28 ± 4,67	89,53 ± 4,48	4,27 ± 0,21

белковых изолятов, полученных при экстракции с различными значениями pH, представлена на рисунке 8.

При высоких значениях pH наблюдается повышенная растворимость и стабильность белковых фракций, что облегчает экстракцию. Цвет изолята при экстракции становится темнее (с белого до коричневого), однако при pH выше 10 эти изменения визуально незначительны. Сочетание щелочного экстрагирования и последующего осаждения в области ИЭТ позволяет оптимизировать процесс выделения белка конопли с высоким выходом. В таблице 5 представлен биохимический состав изолята белка конопли, полученный при оптимальных условиях процесса экстракции и осаждения.

По результатам оптимальной экстракции и изоэлектрического осаждения был получен продукт с содержанием сырого протеина на уровне 92,3 % и «истинного» белка 89,5 %. Данные указывают на высокую эффективность процессов высвобождения белка из жмыха конопли и их соответствие ГОСТ Р 72353-2025. Предложенный способ позволяет получить изолят белка конопли с выходом до 80 % относительно содержания белка в исходном сырье.

В дальнейших экспериментах будут определены аминокислотный состав и антиоксидантный потенциал изолята белка, а также выявлены функционально-технологические свойства продукта.

Выводы

В результате проведенного исследования с использованием математического моделирования на основе плана Бокса-Бенкена и методологии поверхности отклика были определены оптимальные параметры щелочной экстракции белка, обеспечивающие максимальную степень извлечения (57,1 % – предсказанные моделью и 61,4 % – полученные экспериментально). Оптимальными условиями являются pH 11,2, температура 52 °C и продолжительность экстракции 3 ч. Высокий коэффициент детерминации ($R^2 = 0,983$) свидетельствует об адекватности регрессионной модели и указывает на ее высокую точность и надежность. Дисперсионный анализ ANOVA подтверждает, что использование хлорида натрия в качестве экстрагента является менее эффективным и приводит к снижению степени экстракции белка на 6,8–13,5 % по сравнению со щелочной экстракцией.

Экспериментально оптимальные условия изоэлектрического осаждения белка конопли находятся в диапазоне pH 4,4–4,6, где достигается чистота белка 92,6–93,1 %. Суммарная теоретическая изоэлектрическая точка (ИЭТ) белка конопли составила 6,95–7,22, однако она не совпадает с экспериментальными данными, что может быть обусловлено влиянием посттрансляционных модификаций белков и электростатических взаимодействий. Для эдестина расчетные значения ИЭТ существенно превышают экспериментально полученные, в то время как у альбумина теоретические и экспериментальные ИЭТ частично согласуются. Это свидетельствует о том, что экспериментальная ИЭТ более точно отражает реальное поведение белка в среде, тогда как теоретическое значение представляет собой упрощенную модель, не учитывающую все физико-химические процессы.

Таким образом, установленные оптимальные параметры экстракции и изоэлектрического осаждения позволяют эффективно извлекать белок из жмыха конопли с высоким выходом, что делает их перспективными для разработки технологий получения белкового изолята. Содержание сырого протеина в конечном продукте составило 92,3 %, «истинного» белка – 89,5 %.

Критерии авторства

Д. И. Алексаночкин – проведение исследования, написание и редактирование рукописи, оформление под требования журнала. И. А. Фоменко – научное консультирование, обсуждение результатов, формулировка выводов. И. А. Детинкин – планирование эксперимента, написание рукописи. И. М. Чернуха – руководство исследованием и его концептуализация. Н. Г. Машенцева – руководство исследованием, написание рукописи, верификация данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution

D.I. Aleksanochkin conducted the research, wrote, and proofread the manuscript. I.A. Fomenko provided scientific counselling, discussed the results, and formulated the conclusions. I.A. Detinkin designed the experiment and wrote the manuscript. I.M. Chernukha supervised the research and developed the concept. N.G. Mashentseva supervised the research, wrote the manuscript, and verified the data.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Список литературы / References

1. Fang B, Peng Z, Chen B, Rao J. Unconventional sources of vegetable proteins: Technological properties. *Current Opinion in Food Science*. 2024;57:101150. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101150>
2. Hadnađev MS, Hadnađev TRD, Pojić MM, Šarić BM, Mišan AČ, et al. Progress in vegetable proteins isolation techniques: A review. *Food and Feed Research*. 2017;44(1):11–22. <http://dx.doi.org/10.5937/FFR1701011H>
3. Fang B, Chang L, Ohm J-B, Chen B, Rao J. Structural, functional properties, and volatile profile of hemp protein isolate as affected by extraction method: Alkaline extraction – isoelectric precipitation vs salt extraction. *Food Chemistry*. 2023;405:135001. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135001>
4. Серков В. А., Кабунина И. В. Конопля посевная – перспективный сырьевой ресурс для масложировой промышленности России. *Международный сельскохозяйственный журнал*. 2023. № 2. С. 188–191. [Serkov VA, Kabunina IV. Prospects of seed hemp for the Russian fat and oil industry. *International Agricultural Journal*. 2023;(2):188–191. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/RJMITYI>
5. Rizzo G, Storz MA, Calapai G. The role of hemp (*Cannabis sativa* L.) as a functional food in vegetarian nutrition. *Foods*. 2023;12(18):3505. <https://doi.org/10.3390/foods12183505>
6. Burton RA, Andres M, Cole M, Cowley JM, Augustin MA. Industrial hemp seed: From the field to value-added food ingredients. *Journal of Cannabis Research*. 2022;4(1):45. <https://doi.org/10.1186/s42238-022-00156-7>
7. Leonard W, Zhang P, Ying D, Fang Z. Hempseed in food industry: Nutritional value, health benefits, and industrial applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020;19(1):282–308. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12517>

8. Banskota AH, Tibbetts SM, Jones A, Stefanova R, Behnke J. Biochemical characterization and *in vitro* digestibility of protein isolates from hemp (*Cannabis sativa* L.) by-products for salmonid feed applications. *Molecules*. 2022;27(15):4794. <https://doi.org/10.3390/molecules27154794>
9. Tang C-H, Ten Z, Wang X-S, Yang X-Q. Physicochemical and functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(23):8945–8950. <https://doi.org/10.1021/jf0619176>
10. Liu M, Toth JA, Childs M, Smart LB, Abbaspourrad A. Composition and functional properties of hemp seed protein isolates from various hemp cultivars. *Journal of Food Science*. 2023;88(3):942–951. <https://doi.org/10.1101/2022.06.01.494437>
11. Karabulut G, Feng H, Yemiş O. Physicochemical and antioxidant properties of industrial hemp seed protein isolate treated by high-intensity ultrasound. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2022;77(4):577–583. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-01017-7>
12. El-Sohaimy SA, Androsova NV, Toshev AD, El Enshasy HA. Nutritional quality, chemical, and functional characteristics of hemp (*Cannabis sativa* ssp. *sativa*) protein isolate. *Plants*. 2022;11(21):2825. <https://doi.org/10.3390/plants11212825>
13. Potin F, Lubbers S, Husson F, Saurel R. Hemp (*Cannabis sativa* L.) protein extraction conditions affect extraction yield and protein quality. *Journal of Food Science*. 2019;84(12):3682–3690. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14850>
14. Алексаночкин Д. И., Фоменко И. А., Алексеева Е. А., Чернуха И. М., Машенцева Н. Г. Получение растительного белка из семян и жмыха промышленной конопли: обзор способов переработки для использования в пищевой промышленности. *Пищевые системы*. 2024. Т. 7. № 2. С. 179–188. [Aleksanochkin DI, Fomenko IA, Alekseeva EA, Chernukha IM, Mashentseva NG. Production of plant protein from seeds and cake of industrial hemp: Overview of processing methods for food industry. *Food System*. 2024;7(2):179–188. (In Russ.)] <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2024-7-2-188-197>
15. Нгуэт Х. Т. М. Исследование процесса экстракции белковых веществ из белого лепестка сои водными растворами минеральных кислот и щелочей. *Успехи в химии и химической технологии*. 2007. Т. 21. № 12. С. 33–35. [Nguet HTM. Extracting protein substances from soya white petals with aqueous solutions of mineral acids and alkalis. *Advances in Chemistry and Chemical Technology*. 2007;21(12):33–35. (In Russ.)] <https://elibrary.ru/QZMGNH>
16. Mondor M, Hernández-Álvarez AJ. Processing technologies to produce plant protein concentrates and isolates. In: Manickavasagan A, Lim L-T, Ali A, editors. *Plant protein foods*. Cham: Springer International Publishing; 2022. pp. 61–108. https://doi.org/10.1007/978-3-030-91206-2_3
17. Mohanta TK, Khan A, Hashem A, Abd_Allah EF, Al-Harrasi A. The molecular mass and isoelectric point of plant proteomes. *BMC Genomics*. 2019;20(1):631. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5983-8>
18. Ajibola CF, Aluko RE. Physicochemical and functional properties of 2S, 7S, and 11S enriched hemp seed protein fractions. *Molecules*. 2022;27(3):1059. <https://doi.org/10.3390/molecules27031059>
19. Dapčević-Hadnadev T, Dizdar M, Pojić M, Krstonošić V, Zychowski LM, et al. Emulsifying properties of hemp proteins: Effect of isolation technique. *Food Hydrocolloids*. 2019;89:912–920. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.12.002>
20. Ma S, Ye A, Singh H, Acevedo-Fani A. Heat-induced interactions between microfluidized hemp protein particles and caseins or whey proteins. *Food Chemistry*. 2025;463:141290. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.141290>
21. Rehman M, Fahad S, Du G, Cheng X, Yang Y, et al. Evaluation of hemp (*Cannabis sativa* L.) as an industrial crop: A review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021;28(38):52832–52843. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16264-5>
22. Li A, Zheng J, Han X, Jiang Z, Yang B, et al. Health implication of lactose intolerance and updates on its dietary management. *International Dairy Journal*. 2023;140:105608. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2023.105608>
23. Isnaini L, Estiasih T, Suseno SH, Lestari LA. The role vegetable proteins to stabilize emulsion: A mini review. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021;924(1):012036. <http://dx.doi.org/10.1088/1755-1315/924/1/012036>
24. Zhang J. Protein-protein interactions in salt solutions. *Protein-protein Interactions-computational and Experimental Tools*. 2012;6:359–376. <https://doi.org/10.5772/38056>
25. Zhang Y, Roman L, Kirkensgaard JJK, Corredig M. Effect of salt extraction on composition, structure, and thermal properties of pea protein. *Food Chemistry*. 2025;144650. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.144650>
26. Cabral EM, Poojary MM, Lund MN, Curtin J, Fenelon M, et al. Effect of solvent composition on the extraction of proteins from hemp oil processing stream. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2022;102(14):6293–6298. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11979>
27. Kozłowski LP. IPC–isoelectric point calculator. *Biology Direct*. 2016;11(1):55. <https://doi.org/10.1186/s13062-016-0159-9>
28. Kozłowski LP. IPC 2.0: Prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. *Nucleic Acids Research*. 2021;49(W1):W285–W292. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab295>
29. Kaur N, Verma A, Girdhar M, Kumar A, Siddiqui MA, et al. Genome-wide analysis of the *Cannabis sativa* cytochrome P450 monooxygenase superfamily and uncovering candidate genes for improved herbicide tolerance. *Frontiers in Plant Science*. 2024;15:1490036. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1490036>

30. Kruchinin AG, Bolshakova EI. Hybrid strategy of bioinformatics modeling (*in silico*): Biologically active peptides of milk protein. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2022;52(1):46–57. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-1-46-57>

31. Potin F, Saurel R. Hemp seed as a source of food proteins. In: Crini G, Lichtfouse E, editors. *Sustainable agriculture reviews 42: Hemp production and applications*. Cham: Springer International Publishing; 2020. pp. 265–294. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41384-2_9

32. Yano H, Fu W. Hemp: A sustainable plant with high industrial value in food processing. *Foods*. 2023;12(3):651. <https://doi.org/10.3390/foods12030651>

Дополнительная информация об авторах / Additional information about the authors

Алексаночкин Денис Игоревич / Denis I. Aleksanochkin ORCID 0009-0000-7677-6583; eLIBRARY SPIN 1732-9580

Фоменко Иван Адреевич / Ivan A. Fomenko ORCID 0000-0003-2478-1705; eLIBRARY SPIN 5861-2838

Детинкин Илья Александрович / Ilya A. Detinkin ORCID 0009-0004-0985-9505; eLIBRARY SPIN 4596-4802

Чернуха Ирина Михайловна / Irina M. Chernukha ORCID 0000-0003-4298-0927; eLIBRARY SPIN 3423-3754

Машенцева Наталья Геннадьевна / Natalia G. Mashentseva ORCID 0000-0002-9287-0585; eLIBRARY SPIN 9791-5806