

KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH KẾT TỦA PROTEIN TỪ DỊCH TRÍCH LY RONG MÈN *Chaetomorpha* sp. BẰNG ACID VÀ CỒN

Nguyễn Thị Bảo Uyên, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Thúy Hương,
Trần Thị Hồng Châu, Lê Thị Hồng Ánh, Trần Chí Hải*

Trường ĐH Công nghiệp Thực phẩm TP.HCM

*Email: haitc@cntp.edu.vn

Ngày nhận bài: 23/10/2018; Ngày chấp nhận đăng: 05/12/2018

TÓM TẮT

Hiện nay, việc nghiên cứu và phát triển các quy trình thu nhận protein từ các nguồn nguyên liệu khác nhau đang được chú trọng và đã đem lại nhiều lợi ích. Rong mền *Chaetomorpha* sp. là một trong những loại nguyên liệu tiềm năng có nguồn protein cao nhưng đang bị loại bỏ một cách lãng phí. Vì vậy, trong nghiên cứu này nhóm tác giả tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất kết tủa cũng như độ tinh sạch của protein sau khi kết tủa bằng các tác nhân acid và cồn như tỷ lệ dịch trích:dung môi, nồng độ dung môi, pH, nhiệt độ và thời gian kết tủa nhằm nâng cao hiệu quả cho quá trình sản xuất protein từ rong *Chaetomorpha* sp. Điều kiện tối ưu đối với phương pháp kết tủa bằng acid là trong điều kiện pH 3, thời gian 90 phút và nhiệt độ 35 °C đã đem lại hiệu suất thu hồi kết tủa protein có thể đạt được là 73,48 % và độ tinh khiết của protein là 41,30%, đối với phương pháp kết tủa protein bằng cồn thì hiệu suất thu hồi đạt được 59,24% và độ tinh sạch là 55,08% với tỷ lệ dịch trích:cồn là 1:4, loại cồn sử dụng là cồn 90%, trong thời gian 50 phút ở nhiệt độ 5 °C.

Từ khóa: Acid, *Chaetomorpha* sp., cồn, kết tủa protein, protein concentrate/isolate.

1. GIỚI THIỆU

Rong nước lợ *Chaetomorpha* thuộc ngành rong lục (*Rhodophyta*), họ rong mền hay rong lông (*Cladopharaceae*), có 191 loài sống ở biển trên khắp thế giới. Dạng sợi không chia nhánh (không có rễ mọc từ hai bên), chỉ có một hàng tế bào, bám vào vật bám bằng tế bào gốc kéo dài, đáy loe rộng thành đĩa bám nguyên hoặc xẻ thùy, có khi hình thành rễ giả. Các tế bào trên thân hình tang trống thắt lại 2 đầu hay hình cầu [1]. Sinh trưởng của rong mền thuộc họ *Chladophoraceae* chịu tác động nhiều bởi các yếu tố môi trường như: ánh sáng, nhiệt độ, độ mặn, pH... Một số nghiên cứu cho rằng rong mền sinh trưởng tốt trong điều kiện pH > 7 và nhiệt độ khoảng 25–30 °C, có ánh sáng đầy đủ. Rong nước lợ thường phân bố ở ao, hồ, thùy vực nước ngọt, lợ, mặn [1, 2]. Chúng thường được thu hồi hoặc tiêu hủy trước một mùa nuôi tôm mới ở các vùng nước lợ như tỉnh Bến Tre, Cần Giờ... Rong *Chaetomorpha* chứa hàm lượng protein cao hơn 10% (w/w) cùng với một số chất dinh dưỡng như các acid amin... nên được xem như là một trong những nguyên liệu tiềm năng để sản xuất protein.

Protein concentrate (PC) được sản xuất từ nguyên liệu giàu protein, đã loại đi phần lớn các tạp chất phi protein và sản phẩm thông thường chứa tối thiểu từ 65% protein trở lên (tính trên hàm lượng chất khô). Protein isolate (PI) là sản phẩm protein đã qua tinh chế và chứa tối thiểu từ 90% protein trở lên. Protein isolate chứa hàm lượng protein cao cùng với lợi thế về các thuộc tính như màu sắc, hương vị và chức năng nên có thể xem là một thành phần

nguyên liệu lý tưởng để sử dụng trong đồ uống, thực phẩm cho trẻ sơ sinh và thực phẩm cho trẻ em dưới 6 tuổi, các sản phẩm có kết cấu như protein và một số loại thực phẩm đặc biệt [3].

Protein có xu hướng tập hợp lại và kết tủa tại điểm đẳng điện (pI). Tại đó, độ hydrate hóa của protein là cực tiểu nên làm tăng tương tác giữa các phân tử protein dẫn đến tạo tủa. Mỗi loại protein có các điểm đẳng điện khác nhau, vì chúng được cấu tạo từ các aminoaxit khác nhau. Do đó, chúng có thể được tách ra bằng cách điều chỉnh độ pH của dung dịch [4].

Phương pháp kết tủa protein bằng tác nhân cồn dựa trên sự tác động cơ bản của việc bổ sung dung môi hữu cơ là làm giảm khả năng hòa tan của nước bao quanh protein do tác động đẩy ra một khối lượng nước lớn và sự cố định một phần phân tử nước bởi quá trình hydrate hóa các phân tử dung môi hữu cơ. Phân tử nước bình thường sắp xếp một cách trật tự xung quanh các đoạn kỵ nước trên bề mặt protein sẽ được thay thế bằng các phân tử dung môi hữu cơ làm giảm độ hoà tan dẫn đến tạo kết tủa protein. Tuy nhiên, dung môi hữu cơ có khả năng làm biến tính protein ngay cả ở nhiệt độ thường [5].

Áp dụng một số phương pháp thu nhận protein với mục tiêu tìm ra điều kiện thích hợp và khả năng thu hồi protein cao nhất. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả tập trung khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kết tủa protein bằng acid và cồn.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Rong *Chaetomorpha* sp. được thu từ các ao nuôi tôm quảng canh ở Thạnh Phú – Bến Tre. Sau đó rửa sạch, phơi khô rồi tiến hành xay nhỏ đến kích thước 0,3 mm. Thu nhận dịch trích từ rong *Chaetomorpha* sp. bằng phương pháp trích ly bằng kiềm NaOH 0,75% với tỷ lệ rong và dung môi là 1:25 (w/v) trong điều kiện nhiệt độ 50 °C. Sau đó, dịch trích ly được ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 30 phút rồi tách bã. Bảo quản dịch trích ở điều kiện lạnh (dưới 4 °C).

Chất chuẩn albumin huyết thanh bò (BSA: Bovine Serum Albumin) được cung cấp bởi Merck (Đức) và thuốc thử Folin–Ciocalteu có nguồn gốc từ Sigma (Đức). Các hóa chất khác đạt yêu cầu của hóa chất dùng trong phân tích.

2.2. Phương pháp thực hiện

2.2.1. Quá trình kết tủa dịch trích protein tại điểm đẳng điện

Dịch chiết sau ly tâm bằng thiết bị ly tâm Hermale Z206A (Đức) được tiến hành kết tủa với sự thay đổi lần lượt độ pH bằng dung dịch HCl 2N hoặc NaOH 2N, từ đó xác định được giá trị pI để thu protein với hiệu suất cao nhất, thời gian và nhiệt độ tủa. Sau đó, toàn bộ mẫu đã xử lý kết tủa được ly tâm ở tốc độ 5500 vòng/phút trong 15 phút, thu tủa. Kết tủa thu được tiến hành xác định hàm lượng chất khô, hàm lượng protein nhằm đánh giá hiệu suất thu hồi và độ tinh khiết protein trong chế phẩm thu được.

2.2.2. Phương pháp kết tủa bằng dung môi hữu cơ ethanol

Dịch chiết được sử dụng để kết tủa với dung môi cồn khi thay đổi lần lượt các điều kiện trích ly như tỷ lệ dịch chiết:cồn, nồng độ cồn sử dụng, thời gian và nhiệt độ quá trình kết tủa. Kế đến, toàn bộ mẫu đã xử lý được tiến hành tương tự như phương pháp kết tủa đẳng điện.

2.2.3. Phương pháp phân tích

Hàm lượng protein hòa tan được xác định bằng phương pháp Lowry với chất chuẩn là albumin huyết thanh bò (BSA) tại bước sóng 750 nm trên máy quang phổ 6600UV-VIS (Nhật) [6].

Hàm lượng chất khô của mẫu và tủa được xác định bằng phương pháp sấy đến khối lượng không đổi ở 105 °C trong tủ sấy Ecocell (Đức) (TCVN 7035: 2002).

2.2.4. Phương pháp xử lý số liệu và công thức tính toán

Số liệu thực nghiệm được xử lý bằng Microsoft Excel 2010, JMP 10. Kết quả được thể hiện dưới dạng giá trị trung bình ± sai số.

Hiệu suất kết tủa protein (Y) và độ tinh sạch của protein (P) được xác định theo công thức (1) và (2). Trong đó: $m_{pro/t}$, $m_{pro/m}$, $m_{ck/t}$ lần lượt là khối lượng protein có trong kết tủa (g), khối lượng protein có trong mẫu nguyên liệu ban đầu (g) và khối lượng chất khô có trong kết tủa (g).

$$Y = \frac{m_{pro/t}}{m_{pro/m}} \times 100 \quad (1)$$

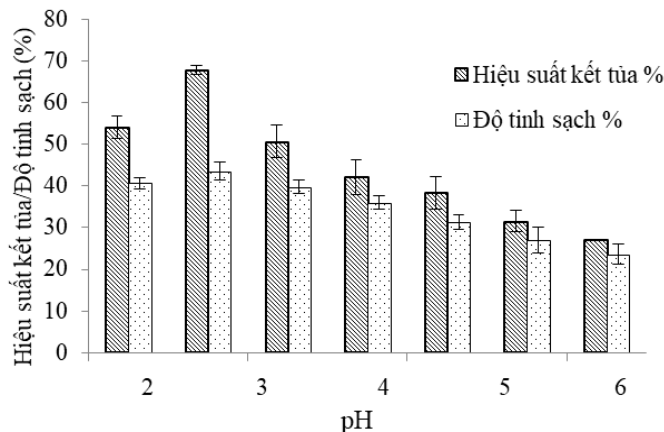
$$P = \frac{m_{pro/t}}{m_{ck/t}} \times 100 \quad (2)$$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của các yếu tố trong quá trình kết tủa dịch trích protein từ rong bằng acid

3.1.1. Ảnh hưởng của pH

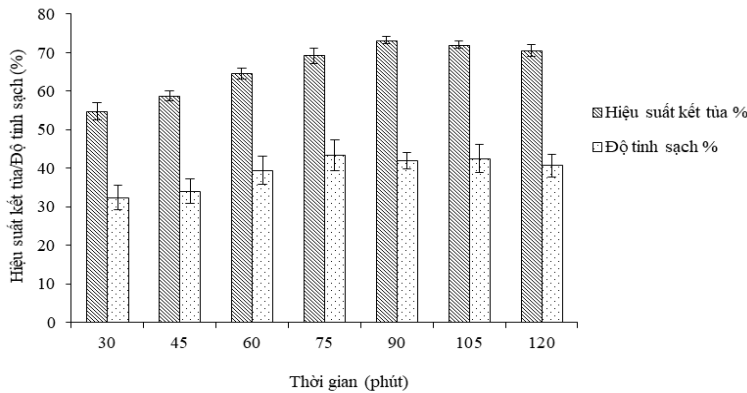
Nhìn chung, hiệu suất kết tủa và độ tinh sạch đều trên 20%. Khi tiến hành điều chỉnh pH từ 8 đến 3 thì hiệu suất kết tủa protein tăng mạnh (tăng 2,5 lần) và đạt cực đại tại pH 3 (67,87%). Tuy nhiên, khi tiếp tục giảm xuống pH 2 thì hiệu suất kết tủa bắt đầu giảm 13,75% so với hiệu suất tại pH 3 và chỉ đạt 54,12%. Quy luật này cũng tương tự đối với độ tinh sạch và đạt kết quả cao nhất ở pH 3 (43,59%) (Hình 1). Kết quả này có thể được giải thích là do ở vùng pH khác 3, các phân tử protein của rong *Chaetomorpha* sp. có khả năng hòa tan rất tốt. Khi thay đổi pH về vùng pI đẳng điện, độ hydrate hóa của protein trong rong giảm dần về vùng cực tiểu. Lúc này, các phân tử protein trung hòa về điện, lực đẩy tĩnh điện giữa chúng không còn, làm cho các protein sẽ hút nhau và tập hợp lại. Tuy nhiên, khi thực hiện phương pháp này cho thấy kết tủa thu được có độ tinh sạch không cao (< 50%) [7].



Hình 1. Ảnh hưởng của pH đến quá trình kết tủa bằng acid

3.1.2. Ảnh hưởng của thời gian kết tủa

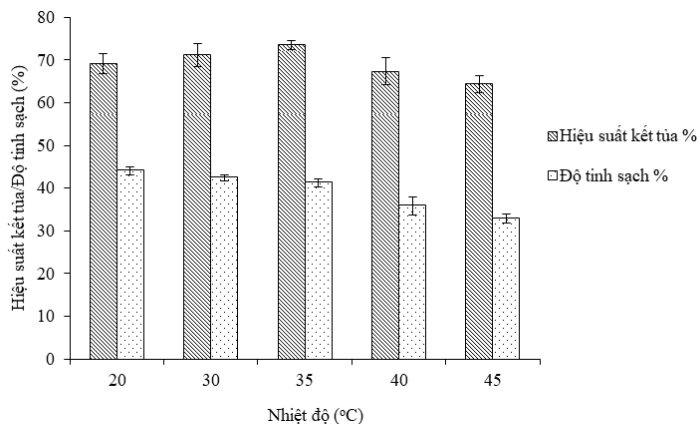
Kết quả ở Hình 2 cho thấy, khi tiến hành thay đổi thời gian kết tủa protein từ 30 phút đến 90 phút thì hiệu suất kết tủa tăng dần từ 54,78% đến 73,16% (tăng 18,38%). Nhưng khi tăng thời gian lên 105–120 phút thì hiệu suất kết tủa bắt đầu giảm xuống 70,51%. Tương tự quy luật thay đổi đối với độ tinh sạch cũng tăng từ 32,34% đến 41,95% (< 50%) khi tăng thời gian từ 30 phút đến 105 phút. Tuy nhiên, khi tăng thời gian đến 120 phút thì độ tinh sạch giảm. Điều này có thể là do thời gian càng kéo dài thì càng tạo điều kiện cho sự tập hợp của các phân tử protein tại vùng pH đẳng điện và làm tăng lượng protein trong kết tủa. Tuy vậy, kéo dài đến một mốc thời gian xác định (thực nghiệm là 90 phút) thì không làm tăng số lượng protein có thể tập hợp, nên cũng không làm tăng hiệu suất kết tủa. Ngoài ra, một số polysaccharide cũng có thể bị kết tủa khi pH thay đổi trong thời gian dài cũng làm giảm độ tinh sạch của protein.



Hình 2. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình kết tủa bằng acid

3.1.3. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Khi tiến hành thí nghiệm thay đổi nhiệt độ từ 20 °C đến 35 °C thì hiệu suất kết tủa protein tăng nhẹ (tăng 4,38%) và đạt hiệu suất cao ở 35 °C là 73,48%. Khi tiếp tục tăng nhiệt độ lên vùng 40–45 °C, hiệu suất kết tủa bắt đầu giảm xuống còn 64,36% (giảm 9,12%). Đối với độ tinh sạch thì khi thay đổi nhiệt độ tăng từ 20 °C đến 45 °C, độ tinh sạch của protein giảm dần từ 44,11% xuống 32,95% nhưng sai khác giữa các mốc nhiệt độ khá nhỏ (Hình 3). Điều này có thể là vì khi tăng nhiệt độ, vận tốc di chuyển và bề mặt tiếp xúc giữa dung môi - cơ chất sẽ tăng nên sự tụ hợp tủa cũng sẽ xảy ra nhanh hơn nhưng khi tăng nhiệt độ lên trên 40 °C, ở nhiệt độ này trở lên có thể gây biến tính protein, đặc biệt trong trường hợp này pH thấp, vì thế làm giảm hiệu suất cũng như độ tinh sạch của protein.

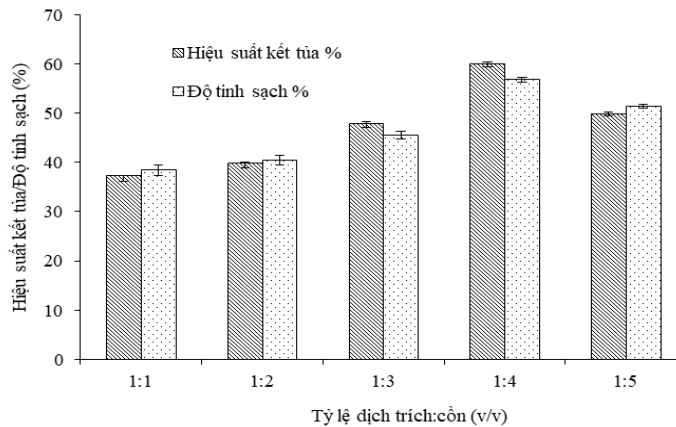


Hình 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình kết tủa bằng acid

3.2. Ảnh hưởng của các yếu tố trong quá trình kết tủa dịch trích protein từ rong biển cồn

3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích ly:dung môi

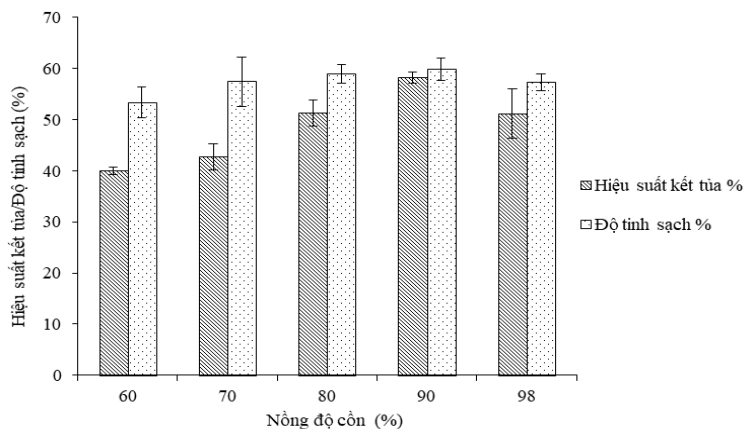
Với cùng điều kiện kết tủa giống nhau, khi tiến hành thay đổi tỷ lệ dịch trích ly:cồn từ tỷ lệ 1:1 lên 1:4 thì hiệu suất kết tủa tăng dần từ 37,27% đến 59,92% (tăng 22,65%). Tuy nhiên, khi tăng tỷ lệ lên 1:5, hiệu suất kết tủa bắt đầu giảm xuống còn 49,84% (giảm 10,08%). Quy luật này tương đương đối với độ tinh sạch, đó là độ tinh sạch cũng tăng dần và đạt 56,74% (tỷ lệ 1:4) và giảm còn 51,38% (ở tỷ lệ 1:5), giảm 0,1 lần so với tỷ lệ 1:4 (Hình 4). Điều này có thể là do khi tăng tỷ lệ dịch trích:cồn thì cũng làm tăng khả năng tiếp xúc giữa dung môi (cồn) và cơ chất (protein) càng lớn. Mặt khác, phân tử nước bình thường sắp xếp một cách trật tự xung quanh các đoạn kỵ nước trên bề mặt protein sẽ được thay thế bằng các phân tử dung môi hữu cơ làm giảm độ hoà tan của chúng.



Hình 4. Ảnh hưởng của tỷ lệ dịch trích:dung môi đến quá trình kết tủa bằng cồn

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ cồn

Kết quả nghiên cứu cho thấy, khi tiến hành thay đổi nồng độ cồn từ 60% đến 90%, hiệu suất thu hồi kết tủa tăng dần (tăng 18,22%) và đạt cực đại tại 90% (58,20%). Nhưng khi tăng nồng độ lên 98%, hiệu suất kết tủa bắt đầu giảm xuống 51,15% (giảm 7,05%) so với khi tiến hành kết tủa ở nồng độ cồn 90%. Độ tinh khiết cũng tăng dần đến 59,79% khi tăng nồng độ cồn đến 90% và giảm xuống còn 57,33% khi tăng nồng độ cồn lên 98% (Hình 5).

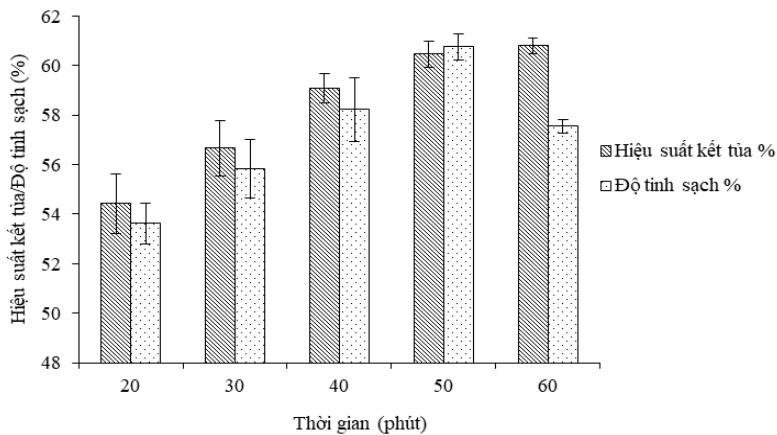


Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ cồn đến quá trình kết tủa bằng cồn

Lý giải cho điều này là do tác động việc bổ sung dung môi hữu cơ sẽ làm giảm khả năng hòa tan của nước bao quanh protein do tác động đẩy ra một khối lượng nước lớn và sự cố định một phần phân tử nước bởi quá trình hydrate hóa các phân tử dung môi hữu cơ; vì vậy, khi tăng nồng độ cồn thì tác động đẩy nước của dung môi cồn sẽ càng mạnh nên sự tụ hợp của càng cao. Nhưng khi đến một nồng độ cồn quá cao (98%) thì khả năng biến tính và phân hủy protein trong dung dịch tăng, làm giảm hiệu suất thu hồi protein và độ tinh khiết cũng giảm. Mặt khác, khối lượng của thực chất có tăng theo nồng độ cồn tăng nhưng do của thêm một số chất khác và làm mất khả năng hòa tan trở lại của của protein thu được.

3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian kết tủa

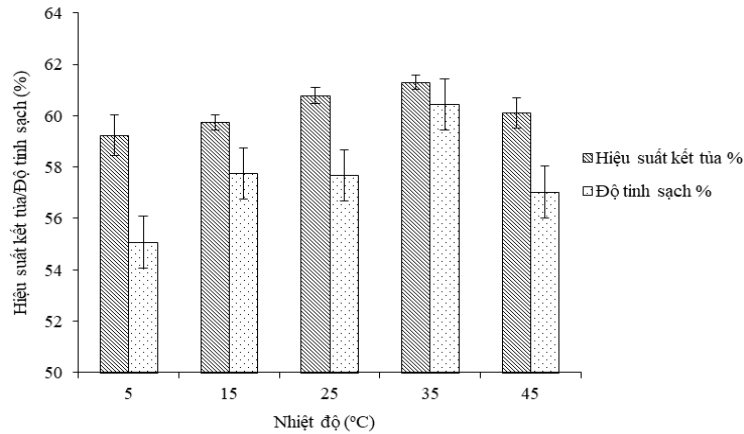
Khi thay đổi thời gian từ 20 phút đến 60 phút, thì hiệu suất thu hồi kết tủa tăng nhẹ từ 54,42% đến 60,79% (tăng 6,37%). Độ tinh sạch có quy luật thay đổi khác so với hiệu suất, đó là tăng dần từ 53,61% đến 60,76% (từ mốc thời gian 20 phút đến 50 phút), nhưng khi tăng lên thời gian là 60 phút, độ tinh sạch bắt đầu giảm xuống còn 57,55% (Hình 6). Điều này có thể do khi tiến hành kết tủa protein bằng cồn theo thời gian thì lượng của nhiều. Thời gian càng kéo dài càng tạo điều kiện cho sự tập hợp các phân tử protein và làm tăng lượng protein trong kết tủa. Tuy nhiên, kéo dài thời gian hơn 50 phút không làm tăng số lượng protein có thể tập hợp, nên cũng không làm tăng hiệu suất kết tủa. Mặt khác, một số tạp chất khác có thể bị kết tủa khiến độ tinh sạch của protein không cao.



Hình 6. Ảnh hưởng của thời gian đến quá trình kết tủa bằng cồn

3.2.4. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nhiệt độ phù hợp của quá trình kết tủa là 35 °C với hiệu suất và độ tinh khiết lần lượt là 61,30% và 60,43% (Hình 7). Nhưng khi tiến hành kết tủa bằng cồn có khả năng làm biến tính protein ngay cả ở nhiệt độ thường. Do vậy, quá trình kết tủa protein bằng dung môi hữu cơ nên được thực hiện ở nhiệt độ thấp 0–5 °C. Ngoài ra, Morr và Lin đã tiến hành nghiên cứu sự thay đổi nhiệt độ ở các mức 0–5 °C, 25 °C, 30 °C và thấy rằng nhiệt độ không phải là yếu tố quan trọng ảnh hưởng nhiều đến số lượng whey protein concentrate khi kết tủa bằng cồn và đã chọn nhiệt độ 0–5 °C là thông số công nghệ tối ưu [8].



Hình 7. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình kết tủa bằng cồn

3.3. So sánh 2 phương pháp kết tủa

Kết quả thực nghiệm của 2 phương pháp kết tủa trong điều kiện tối ưu được thể hiện ở Bảng 1 cho thấy, các phương pháp kết tủa bằng tác nhân acid đem lại hiệu suất kết tủa cao hơn so với phương pháp tủa bằng cồn, nhưng xét về độ tinh sạch của kết tủa protein thì thấp hơn. Điều này được giải thích là do có nhiều protein và các chất phi protein trong dịch trích ly có điểm đẳng điện gần vùng pH 3 nên hàm lượng cặn trong kết tủa lớn dẫn đến độ tinh sạch không cao [7]. Vì vậy, có thể kết hợp cả 2 phương pháp và coi kết tủa bằng tác nhân acid là phương pháp kết tủa thô ban đầu để thu được protein với hiệu suất cao, sau đó có thể kết tủa protein thêm một lần nữa với các tác nhân kết tủa khác như dung môi hữu cơ để tăng độ tinh sạch.

Bảng 1. So sánh hai phương pháp kết tủa protein

STT	Phương pháp thực hiện	Thông số công nghệ tối ưu	Hiệu suất kết tủa (%)	Độ tinh sạch (%)
1	Phương pháp kết tủa bằng acid	+ pH: 3 + Thời gian: 90 phút + Nhiệt độ: 35 °C	73,48 ± 1,13	41,30 ± 0,95
2	Phương pháp kết tủa bằng cồn	+ Tỷ lệ cơ chất:dung môi là 1:4 + Nồng độ cồn: 90% + Thời gian: 50 phút + Nhiệt độ: 5 °C	59,24 ± 0,79	55,08 ± 2,47

4. KẾT LUẬN

Điều kiện phù hợp để kết tủa protein bằng acid là khi bổ sung acid vào dịch trích để đạt pH 3, trong 90 phút, ở nhiệt độ 35 °C. Trong khi đó, quá trình kết tủa protein bằng cồn (90%) sẽ đạt hiệu quả cao nhất với tỷ lệ dịch chiết:cồn, thời gian và nhiệt độ lần lượt là 1:4, 50 phút và 5 °C. Lúc này, chế phẩm protein được thu nhận bằng phương pháp kết tủa bằng acid cho độ tinh sạch thấp hơn 1,33 lần so với phương pháp kết tủa bằng cồn. Tuy nhiên, hiệu suất kết tủa bằng acid cho giá trị cao hơn 1,24 lần so với kết tủa bằng cồn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Đỗ - Thực vật chí Việt Nam, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 2007, tr.510.
2. Dodds W. K., Gudder D. A. - The ecology of *Cladophora*, Journal of Phycology **28** (4) (1992) 415-427.
3. Olaofe O., Arogundade L.A., Adeyeye E.I., Falusi O.M. - Composition and food properties of the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, Tropical Science **38** (4) (1998) 233-237.
4. Hoàng Kim Anh - Hóa học thực phẩm, NXB Khoa học và Kỹ thuật, TP. Hồ Chí Minh, 2007, tr.379.
5. Yoshikawa H., Hirano A., Arakawa T., Shiraki K. - Mechanistic insights into protein precipitation by alcohol, International Journal of Biological Macromolecules **50** (3) 865-871 (2012).
6. Waterborg J.H. - The lowry method for protein quantitation, in: The protein protocols handbook (Walker J.M.(ed.)), 2nd Edn., Humana Press Inc., Totowa (2009) 7-10.
7. Englund S., Seifter S. - Precipitation techniques, Methods in Enzymology **182** (1990) 285-300.
8. Morr C.V., Lin S.H.C. - Preparation and properties of an alcohol-precipitated whey protein concentrate, Journal of Dairy Science **53** (9) (1970) 1162-1170.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PROTEIN PRECIPITATION OF EXTRACT FROM *Chaetomorpha* sp. USING ACID AND ETHANOL

Nguyễn Thị Bảo Uyên, Trần Thị Thu Hà, Nguyễn Thúy Hương,
Trần Thị Hồng Châu, Lê Thị Hồng Anh, Trần Chi Hải*

Ho Chi Minh University of Food Industry

*Email: haitc@cntp.edu.vn

Currently, the research and development of processes for obtaining protein from different materials are increasingly focused on, and bring about many benefits. *Chaetomorpha* sp. is one of the potential ingredients with a high protein content, but it is removed as waste. In this study, the factors affecting the efficiency of protein precipitation and the protein purity after precipitation with acid and ethanol such as extract-to-solvent ratio, solvent content, pH, temperature and duration of protein precipitation were investigated in order to improve the efficiency of protein production from *Chaetomorpha* sp. The method of protein precipitation with acid gave the highest efficiency of protein recovery of 73.48% and the protein purity of 41.30% under the optimal conditions (pH 3, temperature of 35 °C and treatment time of 90 minutes); while for the protein precipitation with ethanol, the protein recovery of 59.24% and the protein purity of 55.08% were achieved under conditions including the extract-to-solvent ratio of 1:4, ethanol 90%, treatment time of 50 minutes at 5 °C.

Keywords: Acid, *Chaetomorpha* sp., ethanol, protein precipitation, protein concentrate/isolate.