

ИССЛЕДОВАНИЕ СОХРАННОСТИ БЕЛКОВОГО КОМПОНЕНТА КОЗЬЕГО МОЛОКА ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

С.В. Симоненко, С.Е. Димитриева¹, Е.Ю. Агаркова¹, Б.С. Гаврюшенко², Н.В. Гавриленко³, Т.Н. Головач⁴, Е.М. Червяковский³, В.П. Курченко³

НИИ детского питания Россельхозакадемии, Истра, ¹Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности, ²ЗАО «ДЕГА – Инжиниринг», Москва, Российская Федерация,

³Белорусский государственный университет, ⁴РУП «Институт мясо-молочной промышленности», Минск, Республика Беларусь

Введение

Обработка ультрафиолетовым (УФ) излучением оказывает сложное и многофакторное воздействие на поликомпонентную систему молока. Направленное воздействие на качественные и количественные характеристики молока, в частности на микробиологическую загрязненность, является весьма актуальной научной проблемой. Ее решение позволит повысить качество и увеличить сроки хранения молока, а также спектра функциональных продуктов на его основе. Специалистами ГНУ ВНИМИ проведен большой цикл научно-исследовательских работ, посвященных этой тематике [1-2].

Свободнорадикальные реакции с участием активных форм кислорода, вызванные УФ-излучением, приводят к окислению специфических групп, а также фрагментации биологических макромолекул: белков и дезоксирибонуклеиновых кислот. Это обуславливает успешное использование УФ-обработки для стерилизации молочного сырья [1-2].

В исследовании Matak K. E. et al. установлено изменение органолептических и химических свойств козьего молока, обработанного УФ-излучением (время экспонирования 18 с; $15,8 \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$ Дж/см²). Выявлен специфический запах, обусловленный увеличением содержания свободных жирных кислот, а также других образующих характерный аромат компонентов [3]. Согласно данным Filipov Zh., в результате воздействия УФ-излучением в течение 5-15 мин существенные изменения в белковом компоненте коровьего молока не обнаружены [4]. В работе J.J. Kehoe et al. количество нативного белка молочной сыворотки – β -лактоглобулина А – после УФ-экспонирования в течение 24 ч уменьшилось на 18%. Денатурационные процессы в белковой глобуле обусловили возрастание свободных сульфгидрильных групп (-SH) и активацию агрегационных процессов. Установленные изменения во вторичной структуре β -лактоглобулина А были аналогичны конформационным перестройкам, вызванным термоденатурацией [5]. Кроме того, белки козьего молока более лабильны по отношению к физическому воздействию в сопоставлении с белками коровьего молока [6].

В связи с этим специалистами НИИДП, ГНУ ВНИМИ и БГУ, было проведено комплексное исследование эффективности УФ-обработки сырого козьего молока.

Целью данной работы является исследование влияния УФ-излучения на свойства белкового компонента козьего молока и его усвояемость.

Методы исследования

В работе использовали цельное козье молоко. Анализировали шесть образцов козьего молока, обработанных ультрафиолетовым излучением с целью стерилизации при следующих режимах: мощность лампы 15 Вт, мощность лампы по ультрафиолетовому излучению - 5 Вт, расход через модуль УФ = 4 л/ч; образец 1 – исходный, без обработки УФ-излучением; 2 - циклическая обработка, 2 цикла, 12 мин; 3 - циклическая обработка, 3 цикла, 18 мин; 4 – циклическая обработка, 4 цикла, 24 мин; 5 – циклическая обработка, 5 циклов, 30 мин; циклическая обработка, 6 циклов, 36 мин.

Получение сыворотки козьего молока. Свежее цельное козье молоко охлаждали до 5°C и центрифугировали при 10 т об/мин в течение 30 мин. Отделяли верхнюю фракцию липидов и осадок. Обезжиренное молоко фильтровали через капроновый фильтр. Активная кислотность (рН) обезжиренного молока по сравнению с рН цельного молока изменялась незначительно и составила 6,5-6,6. В обезжиренное козье молоко, нагретое до 37°C, постепенно вносили 50% раствор HCl до достижения рН 4,5, когда происходит коагуляция казеина. Спустя 30 мин свернувшееся молоко охлаждали до комнатной температуры и отделяли осадок казеина центрифугированием при 5 т об/мин в течение 10 мин. Внесением к полученной сыворотке 1 М раствора NaOH доводили рН до 6,5. С целью удаления солей и углеводов проводили диализ нейтрализованной сыворотки. Для отделения выпавшего осадка казеина диализованную сыворотку фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента); рН очищенной сыворотки составила 6,7.

Для гидролиза козьего молока применяли ферменты: пепсин (Пепсин А из слизистых оболочек желудка свиньи, Марка А, активность 2631, НПО «Биолар», Олайнский завод химреактивов), трипсин (ГОСТ 9002-07-7, «Реахим», Россия).

Протеолиз козьего молока. В случае ферментативного расщепления пепсином для доведения рН реакционной смеси до 2,0 в 1 мл молока или полученной сыворотки вносили 30 мкл 2 М HCl. Гидролиз проводили при температуре 37°C, концентрации фермента 0,0015 и 0,015% в течение 2 ч. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 1,5 М Трис-HCl буфера (рН 8,8). Гидролиз сыворотки трипсином осуществляли в 1,5 М Трис-HCl буфере (рН 8,0) при 37°C, концентрации фермента 0,25% в течение 2 ч. Ферментативную реакцию останавливали внесением в образцы фенилметансульфонилфторида (Phenylmethanesulfonyl fluoride, Sigma, USA) в концентрации 0,1 мМ, после чего пробы использовали для дальнейшего анализа; хранение образцов осуществляли при -20°C.

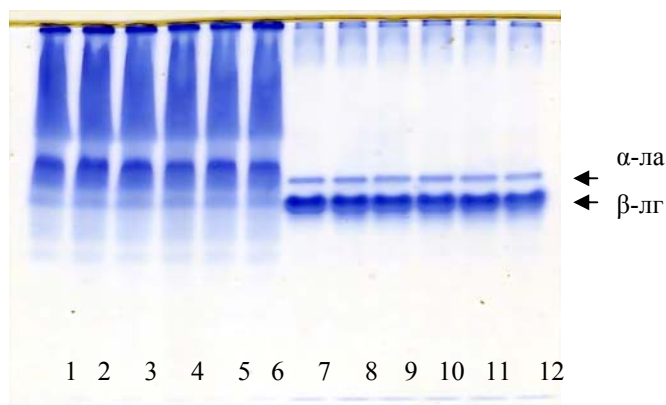
Анализ фракционного состава белков козьего молока. Образцы коровьего молока, полученную сыворотку и их ферментативные гидролизаты анализировали методом нативного и денатурирующего электрофореза в 10 и 16% (рН 8,8) полиакриламидном геле соответственно; рН электродного буфера – 8,3 [7]. В качестве стандартов для нативного и ДСН-электрофореза использовали бычий сывороточный альбумин, β-лактоглобулин и α-лактальбумин (Sigma, USA). Количественную обработку электрофореграмм проводили с использованием специализированного программного обеспечения ImageQuant 5.1. Степень протеолиза определяли как относительное количество расщепленного белка, выраженное в %.

Результаты и обсуждение

Для оценки воздействия ультрафиолетового излучения на белковую составляющую козьего молока было проведено исследование фракционного состава сывороточных белков с помощью нативного и ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле. Результаты электрофоретического разделения белковых фракций козьего молока представлены на рисунке 1. Режимы ультрафиолетового воздействия на образцы 1-6 указаны в разделе «Материалы и методы».

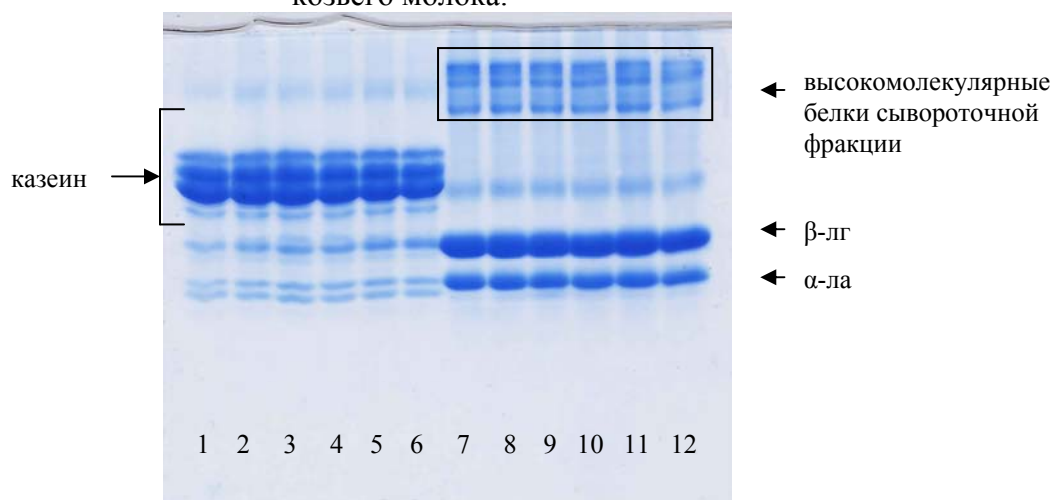
Установлено, что при используемых режимах обработки ультрафиолетовым излучением электрофоретическая подвижность нативных белков молока (рисунок 1, дорожки 1-6) и молочной сыворотки (рисунок 1, дорожки 7-12) не изменяется.

Поликомпонентный состав казеиновой фракции проанализирован с помощью ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле (рисунок 2). Очевидно, ультрафиолетовое воздействие не приводит к изменению качественного и количественного состава полученного кислотным осаждением казеинового сгустка (рисунок 2, дорожки 1-6). Содержание основных сывороточных белков козьего молока: β-лактоглобулин (β-лг) и α-лактальбумин (α-ла) – аналогично контрольному образцу (рисунок 2, дорожки 7-12).



1-6 – образцы коровьего молока; 7-12 – образцы молочной сыворотки, полученные из соответствующих образцов молока

Рисунок 1 – Электрофореграмма образцов козьего молока, обработанных УФ, и сыворотки, полученных кислотным осаждением казеина из соответствующих образцов козьего молока.



1-6 – образцы казеина; 7-12 – образцы молочной сыворотки

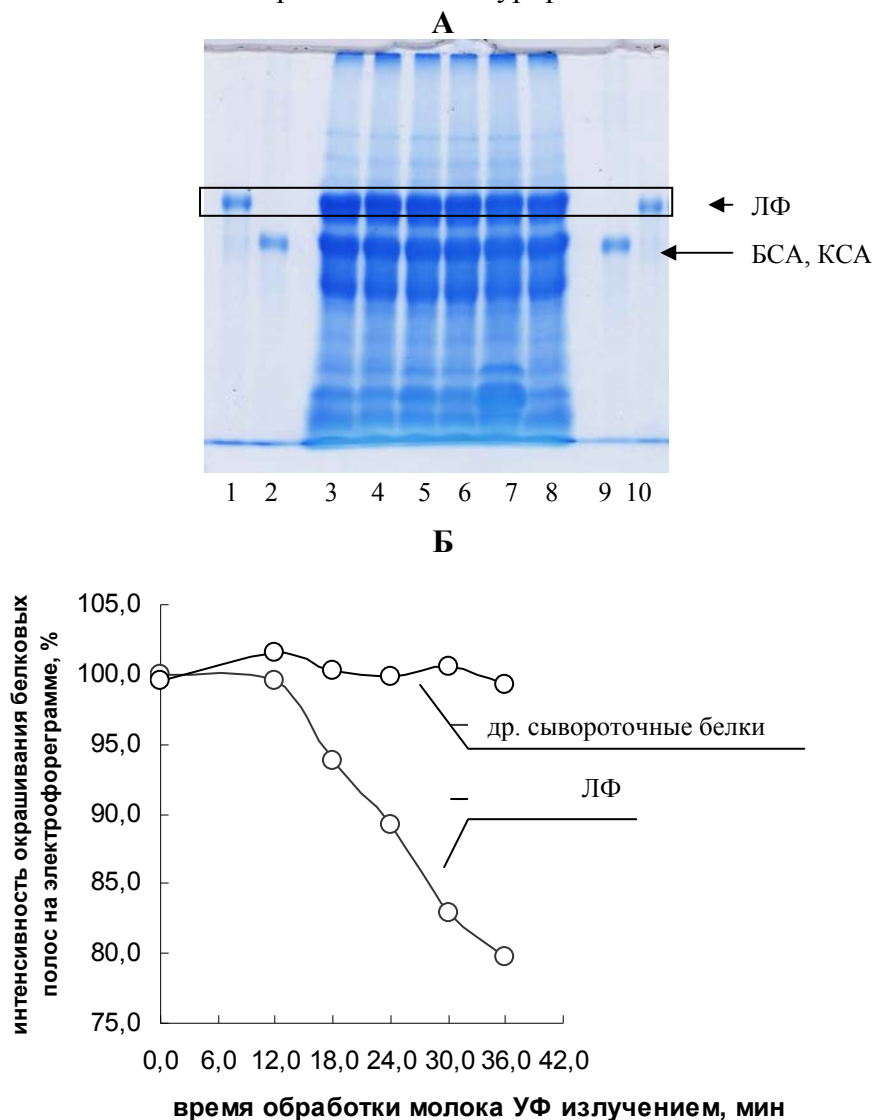
Рисунок 2 – Электрофореграмма белков, содержащихся в казеиновых сгустках и сыворотках обработанного УФ козьего молока, полученных после кислотного осаждения казеина и разделения смеси центрифугированием. SDS – электрофорез в 16 % полиакриламидном геле.

Однако анализ высокомолекулярных белков молочной сыворотки: козьего сывороточного альбумина, лактоферрина, иммуноглобулинов и др. требовал более тонкого разделения указанной высокомолекулярной фракции. Согласно полученным данным, для лактоферрина козьего молока показано снижение содержания в сыворотках, полученных путем кислотного осаждения казеина из молока, обработанного УФ-излучением в течение 18-36 мин. При используемых режимах УФ-воздействия количество лактоферрина в молочной сыворотке уменьшается на 10% в результате обработки в течение 24 мин и на 20% в итоге увеличения времени облучения до 34 мин (рисунок 3А, дорожки 3-8; Б). Другие высокомолекулярные сывороточные белки обнаружены в количествах, аналогичных контрольному образцу.

Таким образом, установлено уменьшение содержания лактоферрина в сыворотке в результате УФ-воздействия на козье молоко. Полученные данные могут быть обусловлены как результатом прямого воздействия УФ-излучения, так и опосредованы тепловой денатурацией указанного белка в процессе УФ-обработки.

Известно, что различные технологические процессы: нагревание, химическая обработка, высокое давление, ферментативный гидролиз и др. – могут изменить аллергенный потенциал и усваиваемость продуктов питания [8-10]. Это обусловлено

изменением пространственной организации белковых макромолекул и разрушением антигенных детерминант в результате физико-химического воздействия, а также фрагментацией полипептидной цепи в случае ферментативного гидролиза. Предварительное воздействие физико-химических факторов, приводящих к разворачиванию белковой глобулы и облегчению доступа к сайтам протеолиза, обуславливает увеличение степени протеолиза денатурированных белков.



А – электрофореграмма высокомолекулярной фракции сывороточных белков козьего молока, подвергнутого УФ-излучению: 1 – лактоферрин (ЛФ), контроль; 2 – БСА, контроль; 3 -8 – образцы 1-6; 9 - лактоферрин, контроль; 10 – БСА, контроль;

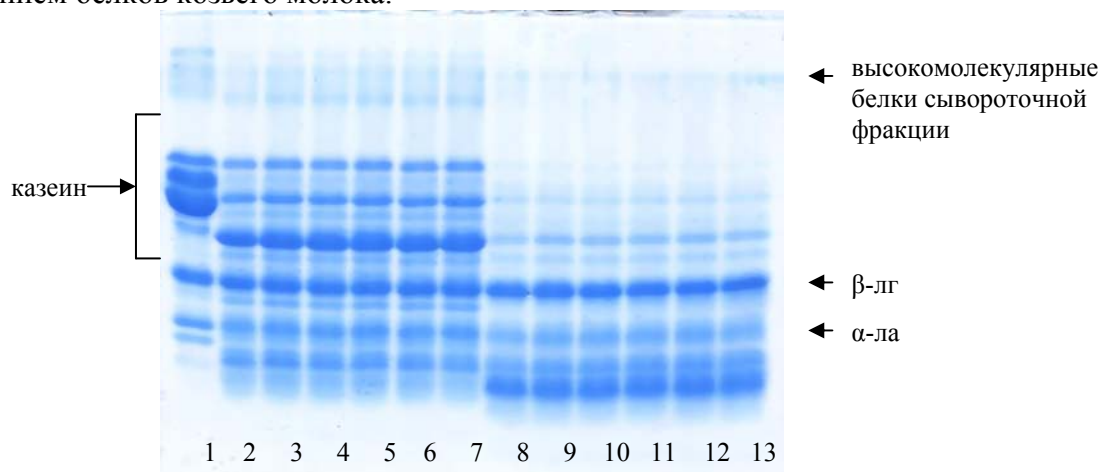
Б - диаграмма, построенная в результате обсчета электрофореграммы (А) с использованием программы Imagequant 5.1.

Рисунок 3 – Зависимость содержания лактоферрина в образцах молочной сыворотки, полученных кислотным осаждением казеина, от продолжительности воздействия ультрафиолетовым излучением

В связи с этим представленные были подвергнуты протеолизу ферментами пищеварительного тракта (пепсином и трипсином) для установления влияния УФ-излучения на пространственную организацию белков козьего молока.

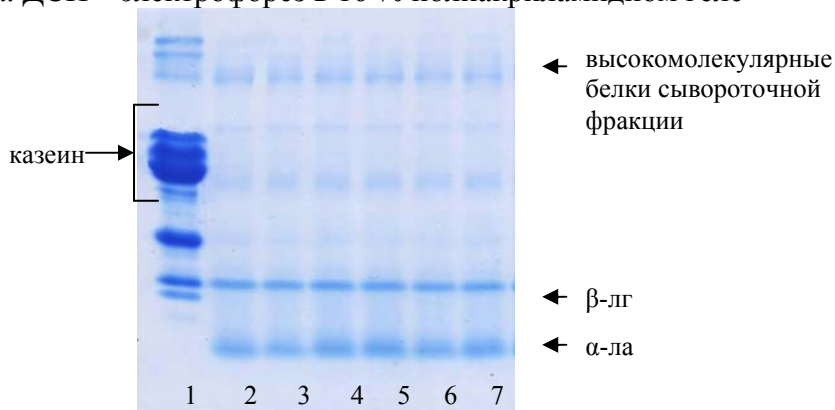
Электрофореграмма продуктов пепсинового гидролиза белков молока, обработанного УФ-излучением, представлена на рисунке 4.

Показано, что в данных условиях интенсивному протеолизу подвергаются высокомолекулярные сывороточные белки (козий сывороточный альбумин, лактоферрин и др.), α -ла, а также фракция казеинов. Однако β -лг остается невосприимчивым к ферментативному воздействию, что соответствует известным данным об устойчивости данного белка к гидролизу в кислой среде [9-10]. Анализ пепсиновых гидролизатов показал, что количество расщепленных белковых субстратов, а также выявленных пептидных фракций аналогично для всех исследуемых образцов (рисунок 4, дорожки 2-13). Таким образом, ультрафиолетовое воздействие на белки козьего молока при данных режимах не влияет на глубину протеолиза, а следовательно, усваиваемость обработанных УФ-излучением белков козьего молока.



1 – козье молоко, контроль; 2-7 – пепсиновые гидролизаты образцов молока 1-6, концентрация пепсина 0,0015%; 8-13 – пепсиновые гидролизаты образцов молока 1-6, концентрация пепсина 0,015%;

Рисунок 4 – Электрофореграмма пепсиновых гидролизатов обработанного УФ козьего молока. ДСН – электрофорез в 16 % полиакриламидном геле



1 – козье молоко, контроль; 2-7 – трипсиновые гидролизаты образцов 1-6

Рисунок 5 – Электрофореграмма трипсиновых гидролизатов обработанного УФ козьего молока. ДСН – электрофорез в 16 % полиакриламидном геле.

Исследование продуктов трипсинового протеолиза образцов обработанного УФ-излучением козьего молока также не выявило отличий в степени протеолиза казеиновой и сывороточной фракций. Согласно результатам ДСН-электрофоретического анализа гидролизатов установлено практически полное расщепление на пептиды высокомолекулярной фракции сывороточных белков (ЛФ, КСА), основного белка молочной сыворотки и главного аллергена молока – β -лг, а также казеиновой фракции (рисунок 5, дорожки 2-7). Наличие в гидролизатах частично нерасщепленного α -ла, очевидно, обусловлено как субстратной специфичностью фермента, так и устойчивым к протеолизу конформационным состоянием белкового субстрата.

Таким образом, обработка козьего молока УФ-излучением не оказывает влияния на степень протеолиза белков молока пепсином и трипсином и на состав пептидной фракции.

Выводы

Согласно результатам ДСН-электрофоретического анализа, УФ-обработка козьего молока не оказывает влияния на свойства белкового компонента и его усваиваемость. Однако для минорного белка козьего молока - лактоферрина - установлено снижение содержания в молочной сыворотке, полученной кислотным осаждением казеина. Это также может быть обусловлено тепловой денатурацией данного белка во время УФ-обработки.

Список литературы

- 1 Гаврюшенко, Б.С. Промышленная технология, оборудование для очистки молока от микроорганизмов и обогащения витамином D / Б.С. Гаврюшенко, В.Д. Харитонов, С.Е. Димитриева, А.Е. Ларин, Ю.П. Фомичев // Материалы международной научно-практической конференции «Молочная индустрия», 2009. – М.: АНО Молочная промышленность. – 2009. - С. 88-89.
- 2 Харитонов, В.Д. Влияние ультрафиолета на состав и свойства молока / В.Д. Харитонов, Е.А. Юрова // Молочная промышленность. - 2006. - № 7. - С. 32.
- 3 Matak, K. E. Effects of Ultraviolet Irradiation on Chemical and Sensory Properties of Goat Milk / K. E. Matak, S. S. Sumner, S. E. Duncan, E. Hovingh, R. W. Worobo, C. R. Hackney, M. D. Pierson // J. Dairy Sci. – 2007. – Vol. 90. - P. 3178–3186.
- 4 Filipov, Zh. Changes in the total protein and protein fractions in cow's milk irradiated with ultraviolet rays / Zh. Filipov // Vet. Med. Nauki. – 1976. – Vol. 13. - № 4. – P. 45-49.
- 5 Kehoe, J.J. Tryptophan-mediated denaturation of beta-lactoglobulin A by UV irradiation / J.J. Kehoe, G.E. Remondetto, M. Subirade, E.R. Morris, A. Brodtkorb // J. Agric. Food Chem. – 2008. – Vol. 56. - № 12. – P. 4720-4725.
- 6 Alexander, S. S. A comparison of the denaturation of bovine β -lactoglobulins A and B and goat β -lactoglobulin / S. S. Alexander, C. N. Pace // Biochemistry. – 1973. – Vol. 10. – P. 27-38.
- 7 Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие) / Л.А. Остерман. - М.: Наука, 1981. – 288 с.
- 8 Paschke, A. Stability of bovine allergens during food processing / A. Paschke, M. Besler // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2002. – Vol. 89. – P. 16-20.
- 9 Guo, M. R. Susceptibility of β -lactoglobulin and sodium caseinate to proteolysis by pepsin and trypsin / M. R. Guo, P. F. Fox, A. Flynn, P. S. Kindstedt // Journal of Dairy Science. – 1995. - Vol. 78. - № 11. – P. 2336–2344.
- 10 Takagi, K. Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion / K. Takagi, R. Teshima, H. Okunuki, J. Sawada // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2003. – Vol. 26. – P. 969–973.