

УДК 543.545.4: 547 96

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМА ПАСТЕРИЗАЦИИ НА ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ МОЛОКА

¹Балакирева Ю.В., ²Зайцев С.Ю., ³Каримова Ф.Г., ³Акулов А.Н., ¹Ахмадуллина Ф.Ю.

¹ФГОУ ВПО «Казанский государственный технологический университет»,

Казань, e-mail: balakirevajulia3@mail.ru;

²ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии имени К.И. Скрябина», Москва, e-mail: szaitsev@mail.ru;

³Учреждение Российской академии наук «Казанский институт биохимии
и биофизики» КНЦ РАН, Казань

В настоящее время возрастает роль продуктов питания, характеризующихся высокой биологической ценностью. Одним из таких продуктов является молоко. Однако в процессе тепловой обработки молока возможно протекание деструктивных процессов, приводящих к снижению его биологической ценности. В связи с этим мы исследовали влияние промышленных режимов пастеризации коровьего и козьего молока на изменение их полипептидного состава. Основными методами исследования в работе являлись 1DE и 2DE. Данные 1DE и 2DE свидетельствуют о меньшей термоустойчивости козьего молока в сравнении с коровьим. При всех режимах пастеризации степень деструкции нативных ПП достигает 38–51% от исходного для коровьего молока и 82–88% для козьего. Наименьшее разрушение нативных ПП молока наблюдается при режиме пастеризации 76 °С, 5 мин.

Ключевые слова: биохимия молока, пастеризация, полипептидный состав

INFLUENCE OF TREATMENT PASTEURIZATION TO POLYPEPTIDE COMPOSITION OF MILK

¹Balakireva J.V., ²Zaitsev C.Y., ³Karimova F.G., ³Akulov A.N., ¹Ahmadullina F.U.

¹Kazan state technological university, Kazan, e-mail: balakirevajulia3@mail.ru;

²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, e-mail: szaitsev@mail.ru;

³Establishment Russian Academy of Sciences Kazan institute of biochemistry and biophysics, Kazan

At the present time role of the traditional foods with high bioavailability rises. One of these foods is milk. However, there are destruction processes during heat treatment of milk. It may decrease bioavailability of milk. In this connection we investigated the changes of the polypeptide compositions of cow and goat milk during pasteurizations. The main research methods were 1DE and 2DE. Some 1DE and 2DE data testified the less thermal stability of the goat milk in comparison to the cow milk. Degree of destruction milk's polypeptides was 38–51% for cow milk and 82–88% for goat milk during all conditions of heat treatment. Minimal destruction of the native polypeptides of goat milk was occurred at 76 °C during 5 min. of pasteurizations.

Keywords: biochemistry of milk, pasteurization, polypeptide composition

Молоко и молочные продукты составляют существенную часть современной индустрии питания, в связи с их высоко сбалансированным составом [4–6]. Однако тепловая обработка молока является обязательной технологической операцией, необходимой для уничтожения патогенных микроорганизмов в молоке перед его переработкой на заводах. Вместе с тем высокие температуры могут вызвать нежелательные физико-химические изменения белковой системы молока, приводящие к нарушению его коллоидной стабильности, снижению пищевой и биологической ценности, ухудшению вкуса и запаха [5].

В связи с этим целью работы было сравнительное исследование влияния наиболее распространенных промышленных режимов пастеризации (65 °С, 30 мин; 76 °С, 5 мин; 90 °С, 20 с; 95 °С, 5 мин) коровьего и козьего молока на их полипептидный состав.

Методы и материалы исследования

Для исследования брали утренние пробы коровьего и козьего молока. Нагрев молока осуществлялся

с максимально возможным сокращением времени нагрева. После термообработки молоко быстро охлаждали до температуры ферментации (29–32 °С). Белок молока осаждали ледяным ацетоном (1:2) и центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об/мин. Осадок промывали ледяным ацетоном три раза. Разделение белков осуществляли с помощью одномерного электрофореза (1DE) согласно Леммли [9], в градиентном (6–16%) полиакриламидном геле (ПААГ). Разделение белков с помощью двумерного электрофореза (2DE) в первом направлении (ИЭФ) проводили с помощью самостоятельно изготовленных гелей (4% акриламид, 0,1% бисакриламид, 8 М мочевины, 1% амфолита, 2% ХАПС) в стеклянных трубочках (Bio-Rad) размером 1,0×180,0 мм. В качестве верхнего электродного буфера использовали 50 мМ NaOH, нижнего – 20 мМ H₂PO₄. Для 2DE белок растворяли в ИЭФ-буфере (8 М мочевины; 2 М тиомочевина; 2% ХАПС; 0,2% амфолита pH 3-10; 30 мМ ДТТ и 20 мМ Трис). Пробы фокусировали по следующей программе: 1 ч при 100 В, 1 ч при 200 В, далее каждый час повышали напряжение на 100 В до достижения 700 В (напряжение постоянное; сила тока не должна превышать 0,7 мА). Затем гели выдерживали 15 мин в уравновешивающем буфере (6 М мочевины; 2% ДСН; 30% глицерин; 50 мМ Трис-HCl; следы бромфенолового синего и 2% ДТТ) и накладывали на 2D-мини-гель (6–16% ПААГ). 2DE

проводили с использованием электродного буфера, содержащего 25 мМ Трис-НСl; 192 мМ глицина и 0,1% ДСН, при силе тока 5 мА на 1 гель в течение 20 мин, затем при 10 мА в течение 120–150 мин. Для визуализации белков гели окрашивали 0,1-м% спиртовым раствором Кумасси R-250 в течение 10 мин, затем отмывали 50-м% этанолом. Гели сканировали при помощи Epson Perfection 3170 Photo, и данные переводили в числовые значения оптической плотности при помощи программы Scion Image (Великобритания) и Flickr

(<http://open2dprot.sourceforge.net/Flicker>) (США). Эксперименты проводили в трех повторностях, 2–3 серии.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе разделение белков молока осуществлялось с помощью 1ДЕ. Спектры полипептидов коровьего и козьего молока приведены на рис. 1.

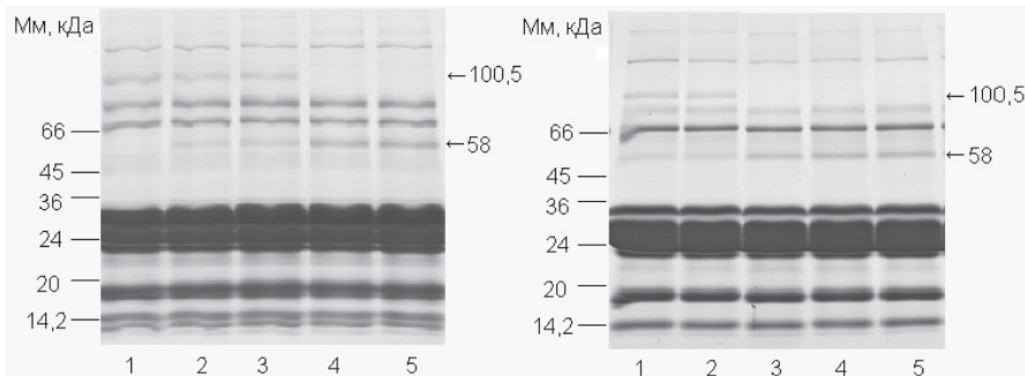


Рис. 1. Влияние режимов пастеризации на спектры полипептидов коровьего (а) и козьего (б) молока: 1 – контроль; 2 – 65 °С – 30 мин; 3 – 76 °С – 5 мин; 4 – 90 °С – 20 с.; 5 – 95 °С – 5 мин. На треки наносили по 80 мкг белка

Данные рис. 1 свидетельствуют, что изменения при пастеризации молока обоих типов наблюдаются в основном у двух полос полипептидов (ПП) с мол. массой 58 и 100,5 кДа: при увеличении содержания первой умень-

шается содержание последней. Более детальное исследование протеома молока позволяет метод 2ДЕ. Спектры ПП нативного коровьего и козьего молока, разделенных методом 2ДЕ, приведены на рис. 2, 3.

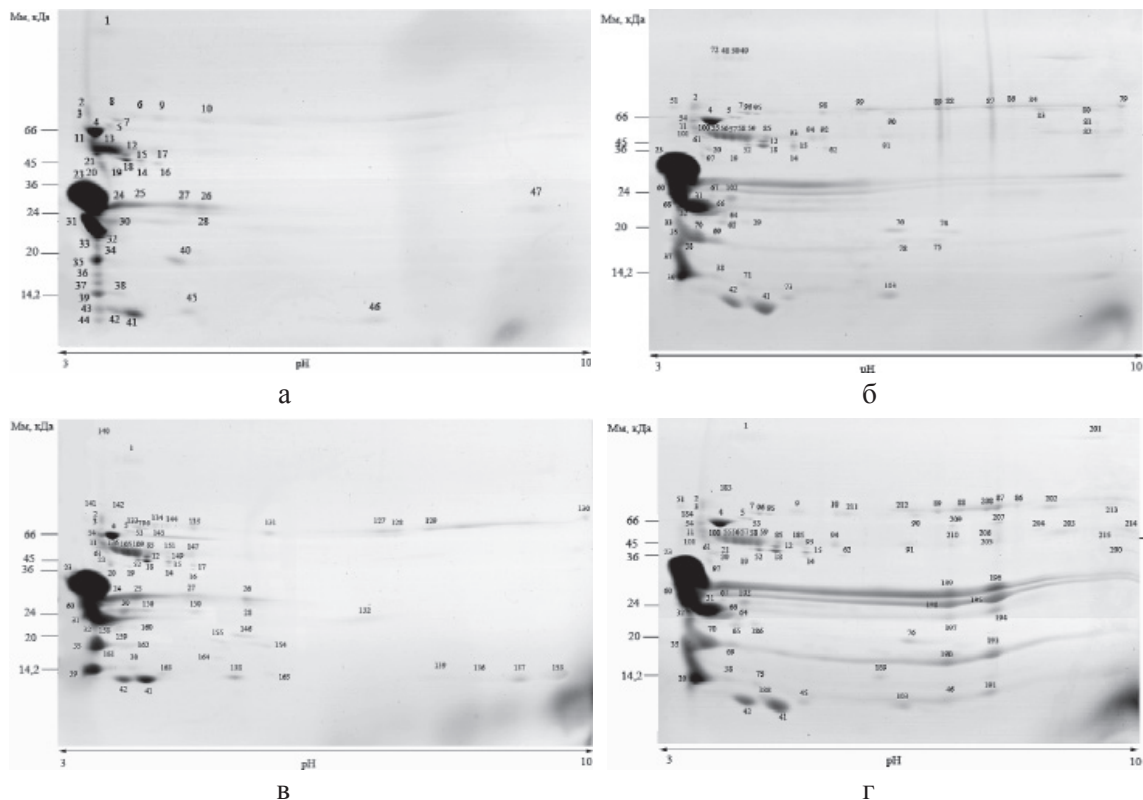


Рис. 2. Влияние режимов пастеризации на полипептиды коровьего молока: а – исходное; б – 65 °С – 5 мин; в – 90 °С – 20 с.; г – 95 °С – 5 мин. Нагрузка белка на гель 625 мкг

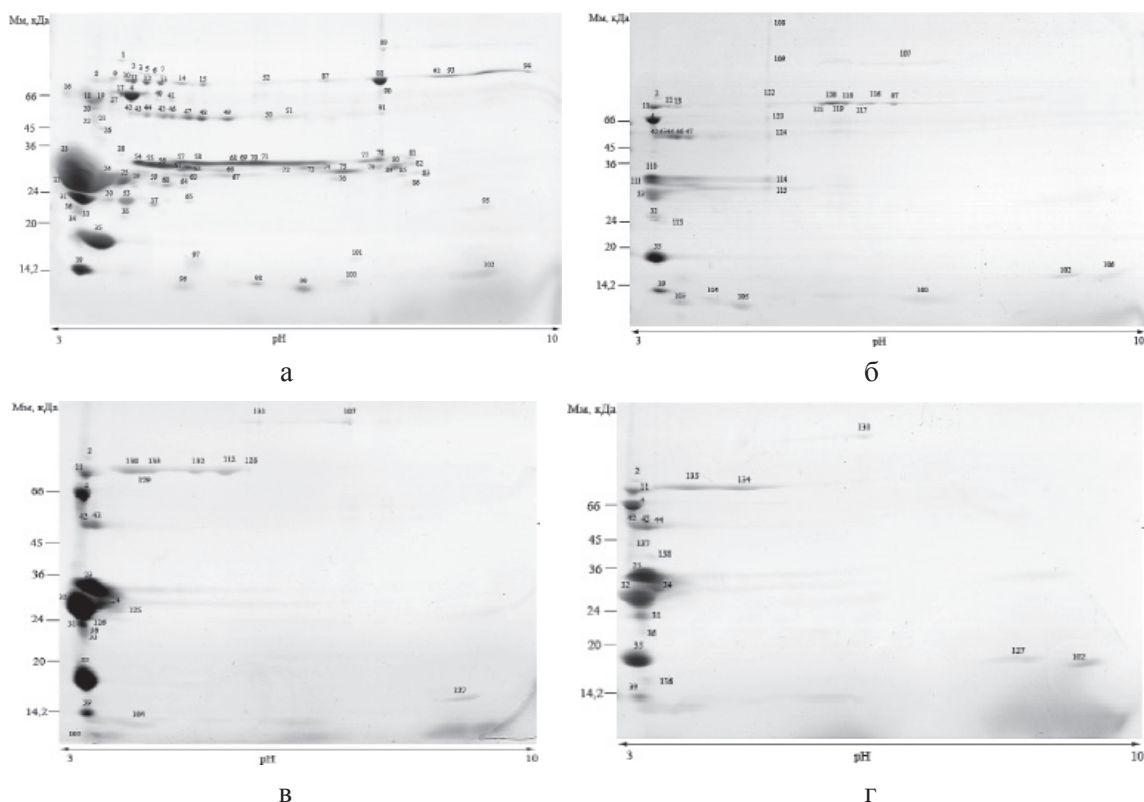


Рис. 3. Влияние режимов пастеризации на полипептиды козьего молока:
 а – исходное; б – 76 °С – 5 мин; в) 90 °С – 20 с; г – 95 °С – 5 мин. Нагрузка белка на гель 400 мкг

Данные разделения белков молока методом 2DE свидетельствуют, что количество и содержание отдельных ПП в коровьем молоке (даже при большей нагрузке на гель в 1,5 раза) (рис. 2а) значительно меньше в сравнении с козьим (рис. 3а): отличие наблюдается как в количестве и содержании мажорных, так и минорных белков. Большинство ПП молока с большим содержанием выявлены в кислой области за исключением ПП №88 в козьем молоке. Согласно данным литературы большинство из них представляют изоформы казеинов, а также α -лактальбумин и β -лактоглобулин [3]. Данные рис. 3а указывают, что в полипептидном спектре козьего молока наблюдаются десятки ПП в щелочной области, которые отсутствуют в спектре ПП коровьего молока. Температурная обработка при различных режимах изменяла спектры ПП как коровьего (рис. 2), так и козьего (рис. 3) молока. Как свидетельствуют полученные данные, при всех режимах термообработки наблюдается как исчезновение ПП, так и появление новых. Пастеризация коровьего молока в любом режиме повышает число выявляемых ПП (рис. 2). Появление новых ПП было более значительно для коровьего молока, в области с мол. массой больше 36 кДа, что может быть связано с разрушением оболочек

жировых шариков и выходом оболочечных белков в плазму молока [7, 8].

Согласно данным, представленным на рис. 4, наиболее жестким режимом обработки коровьего молока является 65 °С – 30 мин, так как при данном режиме исчезает максимальное число нативных ПП. Остальные режимы пастеризации коровьего молока вызывают одинаковое количество разрушенных ПП. Для козьего молока более мягким из всех исследованных режимов пастеризации по количеству разрушенных ПП является 76 °С – 5 мин.

Исчезновение ПП при пастеризации, выявленных методом 2DE, может быть связано как с их деградацией, так и с агрегацией с другими белками в результате термообработки, что определяет понижение их растворимости, и в том числе осаждение на стенках оборудования [3].

Нативные ПП козьего молока № 23, 32 и 31, которые, очевидно, относятся к казеинам, подвергаются при пастеризации существенным изменениям по сравнению с коровьим молоком. Известно, что в процессе нагревания, начиная с 65 °С и выше, в результате образования внутримолекулярных дисульфидных связей между к-казеином и β -лактоглобулином формируется комплекс, который предохраняет мицеллу казеина от коагуляции при высоком нагреве [2].

Авторы [1] показали, что в козьем молоке содержится меньше β-лактоглобулина, чем в коровьем. В связи с этим мицеллы казеина могут образовывать крупные агрегаты и осаждаться на стенках оборудования.

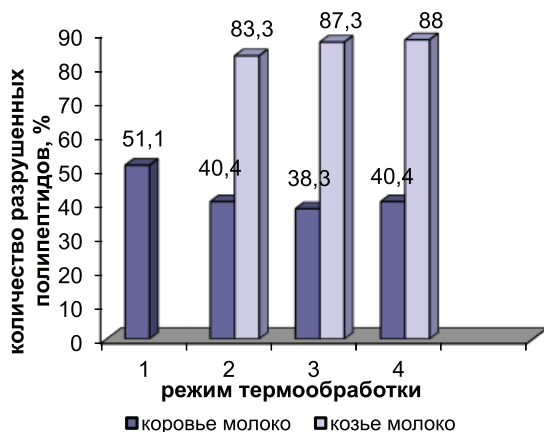


Рис. 4. Влияние режимов обработки на изменение числа полипептидов коровьего и козьего молока:
 1 – 65 °С – 30 мин; 2 – 76 °С – 5 мин;
 3 – 90 °С – 20 с; 4 – 95 °С – 5 мин

Следует отметить, что для ПП коровьего молока (№ 4, 5, 7, 2) при термообработке характерно их смещение в щелочную сторону (рис. 2). Это может быть вызвано посттрансляционными модификациями ПП при термообработке, что вызывает значительные изменения нативных свойств белков [2]. Наши результаты, представленные на рис. 3, указывают, что ряд ПП козьего молока (№ 2, 4, 11, 42, 43, 44, 46, 47) при термообработке смещается в кислую сторону.

Полученные нами данные показывают взаимное влияние температуры и времени выдержки на изменения в полипептидном составе коровьего и козьего молока. При всех режимах пастеризации степень

деструкции нативных ПП достигает 38–51% от исходного для коровьего молока и 82–88% для козьего. Наиболее жестким режимом пастеризации для коровьего молока является 65 °С – 30 мин. Результаты изучения влияния режимов пастеризации козьего молока свидетельствуют о том, что режим пастеризации 76 °С – 5 мин вызывает наименьшее разрушение нативных ПП в сравнении с другими изученными режимами.

Список литературы

1. Конь И.Я., Денисова С.Н., Вахрамеева С.Н. // Детский доктор. – 2001. – №1. – С. 59–61.
2. Меркушева И.Н., Петриченко С.П., Кожухова М.А. // Известия вузов. Пищевая технология. – 2005. – № 2–3. – С. 44–46.
3. Остроумова Т.Л., Фриденберг Г.В., Волкова Л.Г. // Молочная промышленность. – 2005. – №8. – С. 69–70.
4. Laemmli, U.K. // Nature. – 1970. – Vol. 227, №4. – P. 680.
5. Горбатова К. К. Химия и физика белков молока. – М.: Колос, 1993. – 192 с.
6. Cavaletto M., Giuffrid M. G. // Bioactive Components of Milk. Z. – 2008. – Vol. 720. – P. 129–141.
7. Barello C., Garoffo L.P. et al. // Mol. Nutr. Food Res. – 2008. – Vol. 52. – P. 1448–1456.
8. Бирюкова З.А. Термоустойчивость. – М., 1973. – 51 с.
9. Баранова М.Г., Осташевская Д.М., Красникова Л.В. // Молочная промышленность. – 2005. – №8. – С. 13–16.

Рецензенты:

Ежкова М.С., д.в.н., профессор кафедры технология пищевых производств, ФГБОУ «Казанский национальный исследовательский технологический университет», г. Казань;

Максимов В.И., д.б.н., профессор кафедры физиологии животных, ФГБОУ «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», г. Москва.

Работа поступила в редакцию 14.12.2011.