

**Донская Галина Андреевна, зав. лаб., д.б.н.,
Чумакова Ирина Валерьевна, в.н.с., к.т.н.,
Дрожжин Виктор Михайлович, с.н.с.,
Добриян Екатерина Ивановна, в.н.с., к.т.н.**

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (Россия, г.Москва)

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА НАТИВНОГО МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ БЕЛКОВ

Аннотация. Исследованы физико-химические показатели нативного молока, получаемого из индивидуального хозяйства Подмосковья. Определена антиоксидантная активность натурального, термически необработанного молока и выделенных из него молочных белков.

Ключевые слова: нативное молоко, казеин, сывороточные белки, антиоксидантная активность.

**Donskaya Galina Andreevna, laboratory chief, D.E.,
Chumakova Irina Valerjevna, leading researcher, Ph.D.,
Drozhin Viktor Michailovitch, senior researcher,
Dobriyan Ekaterina Ivanovna, leading researcher, Ph.D.
All-Russian Dairy Research Institute (Russia, Moscow)**

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF NATIVE MILK AND MILK PROTEINS

Abstract. The physical-chemical indices of native milk obtained from the vicinities of Moscow have been studied. The antioxidant activity of the native, heat untreated milk and isolated from them milk proteins were determined.

Key words: native milk, casein, whey proteins, antioxidant activity.

Среди факторов, ответственных за защиту организма от неблагоприятного воздействия окружающей среды, важное значение имеют соединения, обладающие антиоксидантными свойствами. Они, как известно, выполняют роль стабилизаторов биологических мембран и инактивируют свободные радикалы, препятствуя развитию цепных свободно-радикальных процессов окисления молекулярным кислородом органических соединений, прежде всего ненасыщенных тканевых липидов. До недавнего времени основное внимание уделялось антиоксидантам в виде флавоноидов, витаминов А, С, Е, бета-каротина [1-3]. Со временем появляются сведения об антиоксидантной активности других соединений, в частности компонентов молока [4,5]. Современными исследованиями уделяется большое внимание биологической роли белков молока, что особенно важно при создании продуктов функциональной направленности.

Известно, что коровье молоко проявляет антиоксидантную и бактериостатическую активность главным образом благодаря присутствию таких антибактериальных белков, как лактоферрин, лактопероксидаза и иммуноглобулин. Показано, что потребление сырого (парного) коровьего молока снижает риск возникновения респираторных инфекций [6], тогда как переработанное женское и коровье молоко (после пастеризации, кипячения, ультравысокой температурной обработки) существенно увеличивает риск этого заболевания у новорожденных [7], что можно объяснить разрушением во время нагревания присутствующих в сыром молоке иммуноактивных белков. Тепловая обработка, применяемая в технологии молочных продуктов, может подавлять антиоксидантные и иммуноактивные свойства нативных белков молока [8]. Изучение антиоксидантной активности (АОА) нативного молока и молочных белков, не подвергнутых термической обработке, является актуальным направлением.

Цель данного этапа НИР – определение суммарного содержания водорастворимых антиоксидантов в нативном молоке и выделенных из него молочных белках.

Материалы и методы исследований

Объекты исследований: молоко натуральное, получаемое из индивидуального хозяйства Подмосковья; казеин и сывороточные белки, выделенные из нативного молока.

Методы исследований: физико-химические показатели – плотность, титруемую кислотность, алкогольную пробу, содержание Са и Mg определяли по Инихову и Брио. Активную кислотность, окислительно-восстановительный потенциал определяли на рН-метре иономере «Эксперт-001». Антиоксидантную активность – амперометрическим методом с использованием прибора «ЦВЕТ-ЯУЗА-01-АА», фракционный состав белков - методом ВЭЖХ.

Для выделения белков из нативного молока применяли сычужный фермент и хлористый кальций. Разделение фракций белков проводили на центрифуге с 15000об/мин при 30°С в течение 1,5 часа.

Результаты исследований

Физико-химические показатели молока представлены в таблице 1.

В обезжиренном нативном молоке определяли общее содержание сывороточных белков, в том числе: альбумина, бета-лактоглобулина А, бета-лактоглобулина Б, лактоферрина и бычьего сывороточного альбумина (БСА). Полученные показатели содержания сывороточных белков в единице объема молока пересчитывали на их процентное содержание в общем количестве сывороточных белков. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 1 – Физико-химические показатели нативного цельного молока

| Показатели | Фактические значения |
|--|----------------------|
| Плотность при 20°C, А° | 1,031±0,001 |
| Титруемая кислотность, °Т | 21,5±2,5 |
| Активная кислотность, рН | 6,68±0,04 |
| Окислительно-восстановительный потенциал, mV | 134,6±2,0 |
| Массовая доля жира, % | 3,2 |
| Алкогольная проба с 80% спиртом | выдерживает |
| Антиоксидантная активность, мг/100г | 2,05±0,6 |
| Массовая доля белка, % | 3,28 |
| Содержание общего азота, % | 0,223 |
| Содержание небелкового азота, % | 0,0312 |
| Содержание сывороточных белков, % | 0,66 |
| Содержание казеиновых белков, % | 2,37 |
| Массовая доля Са, мг% | 116±5,3 |
| Массовая доля магния, мг% | 48,5±6,1 |

Таблица 2 – Сывороточные белки нативного молока

| № | Вид белка | Количество белка | | Процентное содержание в общем количестве сывороточных белков, % |
|---|----------------------|--------------------|-----------------|---|
| | | мг/см ³ | мг/100мл молока | |
| 1 | Альбумин | 1,817 | 181,7 | 28,4 |
| 2 | Бета-лактоглобулин А | 0,702 | 70,2 | 10,9 |
| 3 | Бета-лактоглобулин Б | 2,309 | 230,9 | 35,9 |
| 4 | Лактоферрин | 0,071 | 7,1 | 1,07 |
| 5 | БСА | 0,137 | 13,7 | 2,14 |

Фракционный состав нативных сывороточных белков показан на рисунке 1.

Для изучения АОА биологически активных белков молока первоочередной задачей являлось выделение их методами, позволяющими максимально сохранить нативные свойства. Как известно, максимальным изменениям, денатурации и коагуляции, подвергаются белки молока при температурном воздействии более 65°C и изменении активной кислотности до уровня, близкого к изоэлектрической точке определённого вида белка.

Белки молока – казеин, сывороточные белки – по-разному реагируют на воздействие ферментов и химических веществ.



Рисунок 1 – Фракционный состав нативных сывороточных белков

Известно, что сычужный фермент и определённая концентрация солей кальция вызывают коагуляцию казеина даже при нейтральном рН. При сычужном свертывании в осадок выпадает весь казеин-фосфат кальциевый комплекс в таком виде, в каком он находится в молоке. При этом рН молока не изменяется и электроразаряженность белков сохраняется [9,10].

Казеин можно выделить из молока также хлористым кальцием при нагревании, но интенсивность процесса значительно зависит от температуры. По данным П.Ф. Дьяченко, для осаждения казеина при температуре 65 °С достаточно добавить около 3 г/л хлористого кальция, при 95 °С – около 1 г/л.

При ферментном осаждении казеина следует учитывать, что из трех фракций казеина только альфа- и бета-формы подвержены действию сычужного фермента. Для максимально полного выделения казеина, в том числе и гамма-казеина, необходимо было определение оптимального соотношения сычужного фермента и хлористого кальция при температуре не выше 40-45 °С.

Сывороточные белки не подвержены действию фермента. Сыворотка, освобождённая от казеина, представляет собой смесь сывороточных белков, основные из которых – лактоальбумин и лактоглобулин, а также антибактериальные белки: ЛФ, лактопероксидаза, иммуноглобулины.

Следует учитывать действие кальция на состояние сывороточных белков. Рядом исследователей [11] показана стабилизирующая роль ионов кальция в отношении альфа-лактоальбумина и бета-лактоглобулина при тепловой обработке и рН выше 4,5. Так, недостаточность кальция в экспериментах Bernal и Jelen [12] способствовала снижению температуры денатурации с 61,5 до 40,8 °С.

Учитывая стабилизирующую роль кальция на состояние сывороточных белков, можно прогнозировать наиболее эффективное разделение казеина и

сывороточных белков в нативном молоке под действием сычужного фермента в присутствии добавленного кальция. Основной задачей при разработке методики разделения фракций нативных белков молока – казеина и сывороточных белков, было выделение белков без подкисления, при температуре не выше 40⁰С, с применением оптимальных дозировок растворов сычужного фермента и хлористого кальция.

Для выделения белков из нативного молока готовили растворы сычужного фермента и хлористого кальция. Обезжиренное сырое молоко нагревали до (38-40) ⁰С, вносили от 0,5 до 2,0 мл раствора сычужного фермента и от 1,0 до 2,0 мл раствора хлористого кальция. Смесь перемешивали и оставляли при температуре (35-38) ⁰С до образования сгустка и начала отделения сыворотки. Полученный сгусток фильтровали через лавсановый фильтр и измеряли объем полученной сыворотки. В дальнейшем для разделения белков использовали центрифугирование.

Усредненные данные по продолжительности свертывания и характеристика полученного сгустка при различном количестве и соотношении растворов сычужного фермента и хлористого кальция приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Скорость коагуляции белков нативного молока

| № | Кол-во р-ра сычужного фермента, мл/100 мл молока | Кол-во р-ра хлористого кальция, мл/100 мл молока | Время коагуляции, мин. | Объем сыворотки, мл/100 мл молока | Характеристика молочного сгустка |
|---|--|--|------------------------|-----------------------------------|--|
| 1 | 0,3 | 0,6 | 55±5 | 64±3 | Дряблый неоднородный |
| 2 | 0,5 | 0,5 | 40±3 | 65±3 | Дряблый творожистый |
| 3 | 1,0 | 1,0 | 10±2 | 68±4 | Ровный |
| 4 | 1,0 | 2,0 | 5±1 | 76±4 | Плотный с выделением прозрачной сыв-ки |
| 5 | 2,0 | 2,0 | 2±1 | 75±4 | Плотный с выделением прозрачной сыв-ки |

Минимальное время коагуляции 2-5 мин. отмечено у образцов с дозировкой раствора сычужного фермента 1,0-2,0 мл/100 г молока и раствора хлористого кальция – 2,0 мл/100 г. Качество полученного сгустка у этих образцов практически не отличалось и для дальнейших исследований при разделении сывороточных белков и казеина была принята дозировка раствора сычужного фермента – 1,0мл/100 г молока, хлористого кальция – 2,0 мл/100 г.

Таблица 4 – Физико-химические показатели сыворотки, выделенной из нативного молока

| Показатели | Фактические значения |
|--|-------------------------|
| Плотность, А° | 1,026 |
| Титруемая кислотность, °Т | 18,0 |
| Активная кислотность, рН | 5,86 |
| Окислительно-восстановительный потенциал, mV | 180,8 |
| АОА, мг/100 г | 1,8±0,5 |
| Массовая доля белка, % | 0,66 |
| Содержание общего азота, % | 0,153 |
| Содержание небелкового азота, % | 0,0380 |
| Содержание сывороточных белков, % | 0,64 |
| Содержание казеиновых белков, % | Расчётный метод 0,02 |

Показатели белков в сыворотке, выделенной из нативного молока с использованием сычужного фермента и хлористого Са, коррелируют с показателями сывороточных белков в нативном цельном молоке (таблица 1). Полученные результаты подтверждают правильность выбранного соотношения фермент/СаСl₂ для выделения молочных белков из нативного молока.

Подготовка казеиновой фракции белков молока для определения антиоксидантной активности.

Выделенный из молока нативный казеин представляет собой плотную резиновую белковую массу, которую требуется предварительно подготовить для проведения замеров АОА. Как показали наши предварительные исследования, большое значение для получения достоверных результатов имеет приготовление водного экстракта с максимальной концентрацией водорастворимых антиоксидантов казеина.

Первоначально точную навеску казеина (2 г) измельчали, растирали в ступке, помещали в коническую колбу вместимостью 100 см³, добавляли приблизительно 70 см³ дистиллированной воды и ставили на встряхивающий аппарат на 60 мин. По истечении указанного времени экстракт отфильтровывали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 см³, промывали фильтр дистиллированной водой и довели объём фильтрата дистиллированной водой до 100 см³. Было отмечено, что ввиду плотной массы казеина на фильтре оставались частично нерастёртые частицы белка, что могло отрицательно сказаться на концентрации водорастворимых антиоксидантов. Уменьшая навески казеина, полученного ферментативно-кальциевым и кальциевым осаждением, и добиваясь при этом наибольшей степени растирания белка, мы установили, что с уменьшением навески от 2 г до 0,2 г АОА казеина увеличивается. Очевидно, найденное экспериментальным путём соотношение казеин/вода, равное 0,2 г/100мл, обеспечивает максимальный переход водорастворимых антиоксидантов из казеина в жидкую фазу (таблица 5).

Таблица 5 – АОА казеина в зависимости от навески образца

| № | Масса навески казеина в 100 мл раствора, г | Антиоксидантная активность, мг/100 г | | |
|---|--|--------------------------------------|---------------------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 2,0 | 4,1±1,2 | 3,0±0,3 | 3,2±0,3 |
| 2 | 1,0 | 5,7±1,6 | 4,3±1,0 | - |
| 3 | 0,5 | 7,5±2,1 6,8±1,8* | 7,4±1,6 6,5±1,6* | 5,9±1,6 |
| 4 | 0,2 | 22,0±6,0 | 17,0±5,0 | 15,5±1,3 |
| 5 | 0,1 | 21,0±5,9 | 16,0±4,6 | 15,0±1,2 |

*образцы, полученные кальциевым осаждением.

Как следует из анализа полученных результатов, показатели АОА казеина находятся в прямой зависимости от степени экстракции водорастворимых антиоксидантов. Графически зависимость АОА казеина от его навески в 100 см³ дистиллированной воды, характеризующей степень экстракции антиоксидантов, показана на гистограмме (рисунок 2).

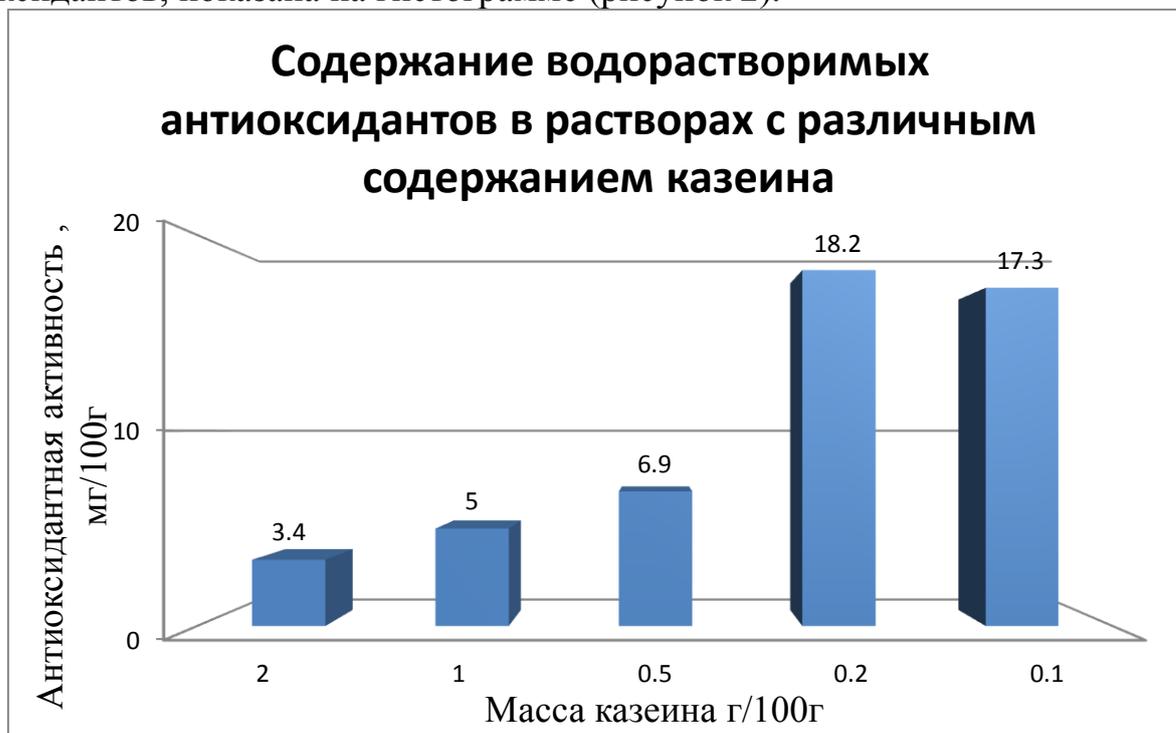


Рисунок 2 – Зависимость АОА казеина от его навески в 100 см³ дистиллированной воды

Суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов определяли амперометрическим методом. Массовую концентрацию антиоксидантов измеряли, используя градуировочный график зависимости выходного сигнала от концентрации галловой кислоты. Метод основан на измерении силы электрического тока, возникающего при окислении молекул антиоксиданта на поверхности рабочего электрода при определенном потенциале, который после усиления преобразуется в цифровой сигнал.

При определении АОА казеина масса навески составляла 0,2 г, для жидких сред (молоко, сыворотка) – от 2 до 5 г. Показатели АОА нативного молока и молочных белков представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Антиоксидантная активность нативного ОМ и молочных белков

| Партии молока | АОА, мг/100 г | | |
|------------------|---------------|----------|-----------------------|
| | ОМ | Казеин | Сывороточные белки |
| 1 | 1,7±0,5 | 21,5±3,7 | 1,5±0,3 |
| 2 | 2,3±0,6 | 20,7±5,7 | 1,6±0,5 |
| 3 | 1,8±0,5 | 19,5±5,0 | 1,8±0,5 |
| 4* | 2,0±0,6 | 15,5±1,3 | 1,7±0,5 |

* цельное нативное молоко.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что значения показателей содержания водорастворимых антиоксидантов в молоке и сыворотке достаточно близки. Это указывает на то, что водорастворимые антиоксиданты молока (витамины С, группы В) практически полностью переходят в сыворотку. Высокая АОА казеина обусловлена, вероятно, образованием биологически активных пептидов в процессе расщепления казеина сычужным ферментом в присутствии хлористого кальция.

Механизм расщепления казеина под действием сычужного фермента до конца не выявлен. Наиболее распространены две теории: фосфоамидазная (П.Ф.Дьяченко) и гидролитическая (Ничман, Але, Гаринье). Согласно первой теории происходит разрыв одной из 2-х связей остатков фосфорной кислоты с казеином, а именно фосфоамидной связи. В параказеине освобождаются щелочные гуанидиновые группы аргинина и гидроксильные группы фосфорной кислоты, которые впоследствии связывают ионы Са и создают кальциевые мостики между мицеллами параказеина.

Авторы гидролитической теории считают, что под действием фермента происходит разрыв пептидной цепи к-казеина, финилаланина в положении 105 и метионина в положении 106. От мицелл казеина отщепляется гликомакропептид, вследствие чего, к-казеин превращается в пара-к-казеин и теряет способность обеспечивать коллоидную устойчивость казеиновых мицелл. Параллельно с биохимическими превращениями происходят физико-химические изменения комплекса [13-15].

Сравнительная характеристика показателей АОА молока и молочных белков показана на рисунке 3 (мг на 100 г).



Рисунок 3 – Сравнительные показатели АОА нативного молока и молочных белков

Выводы.

Определены основные физико-химические показатели нативного молока. Изучен фракционный состав сывороточных белков с максимальным содержанием бета-лактоглобулина Б (35,9% от общего количества сывороточных белков). Титруемая кислотность в различных партиях исследуемого молока соответствовала значению $(21,5 \pm 2,5)$ °Т; активная кислотность (рН) – $6,68 \pm 0,04$; ОВП – $(134,6 \pm 2,0)$ мV. Содержание остеотропных элементов Са и Mg составляло $(116 \pm 5,3)$ мг% и $(48,5 \pm 6,1)$ мг%, соответственно. Белки молока обладали высокой термоустойчивостью и выдерживали алкогольную пробу с 80 % спиртом. Для определения АОА нативных белков разработаны оптимальные условия их выделения с использованием сычужного фермента в присутствии CaCl_2 . Отработана методика подготовки проб казеина для определения в нём водорастворимых антиоксидантов. Определён гидромодуль казеин/вода (0,2 г/100 мл), обеспечивающий максимальную экстракцию антиоксидантов из казеина.

Определено суммарное содержание водорастворимых антиоксидантов (мг/100 г): в цельном $(2,05 \pm 0,6)$ и обезжиренном молоке $(1,93 \pm 0,53)$; казеине $(20,56 \pm 4,8)$, сыворотке $(1,63 \pm 3,4)$; лактоферрине (63 ± 16) .

Установлено, что показатели АОА сывороточных белков близко коррелируют с показателями АОА обезжиренного молока. Полученные результаты являются подтверждением того, что в сыворотку переходят водорастворимые компоненты молока (витамины С, Р, группы В).

Антиоксидантная активность казеиновой фракции более чем в 10 раз превышает АОА молока. Можно предположить, что при коагуляции казеина ферментно-кальциевым способом происходит образование пептидов, обладающих антиоксидантной активностью.

Высокая антиоксидантная активность лактоферрина обусловлена, возможно, катионами трёхвалентного железа, являющегося сильным окислителем. Однако для подтверждения сделанных заключений необходимо проведение дополнительных биохимических исследований.

Список литературы

1. Зобкова З.С., Фурсова Т.П., Зенина Д.В., Гаврилина А.Д., Шелагинова И.Р. Выбор источников биологически активных веществ для функциональных кисломолочных продуктов // Молочная промышленность. 2018. № 3. С. 59-62.
2. Бирюкова З.А., Пантелеева О.Г. Донская Г.А. Влияние комплекса витаминов и микроэлементов на антиоксидантную активность стерилизованного молока // Тр. МНК «Пищевые инновации и биотехнологии». Кемерово, 2015. С. 67-69.
3. Донская Г.А., Дрожжин В.М., Брызгалина В.В. Напитки кисломолочные с повышенным содержанием сывороточных белков и водорастворимых антиоксидантов // Вестник МГТУ. 2018. Т. 21. № 3. С.471-479.
4. Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г. Ферментативная конверсия, как способ получения биологически активных пептидов // Вестник МГТУ. 2018. Т.21. № 3. С. 412-420.
5. Агаркова Е.Ю., Кручинин А.Г., Шерстнева Н.Е. Перспективы использования гидролизатов сывороточных белков в рецептурах молочных напитков // Переработка молока. 2019. № 7. С.10-11.
6. Loss G., Depner M., Ulfman L.H., van Neerven R.J., Nose A.J., Genuneit, Group P.S. Consumption of unprocessed cow's milk protects infants from common respiratory infections // Journal of Allergy Clinical Immunology. 2015. 135 (1). P. 56-62.
7. Dritsakou K., Liosis G., Valsam, G., Polychronopoulos E., & Skouroliakou M. Improved outcomes of feeding low birth weight infants with predominantly raw human milk versus donor banked milk and formula // Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine. 2016. 29 (7). P.1131-1138.
8. Brick T., Ege M., Boeren S., Bock A., von Mutius E., Vervoort J., & Hettinga K. Effect of processing intensity on immunologically active bovine milk serum proteins // 2017. Nutrients. 9 (9). P. 963.
9. Жирова В.Е., Мачнева И.В. Биологически активные пептиды молока // IX Международная студенческая научная конференция. Студенческий научный форум. Оренбург: ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, 2017.
10. Диланян З.Х. Молочное дело. М.: Колос, 1967. С.20.
11. Patocka J., Renz-Schauen A., Jelen P. Protein coagulation in sweet and acid wheys upon heating in highly acidic conditions // Milchwissenschaft. 1986. 41(7). P. 490-494.
12. Лазарева И.В. Свободнорадикальные процессы и антиокислительные свойства молока и кисломолочных продуктов: дис... канд. биол. наук. Омск. 2008. – 130 с.
13. Bernal V., Jelen P. // J. Dairy Sci. 1984.67. P. 2452.
14. Горбатова К.К. Биохимия молока и молочных продуктов. Спб.: Гиорд, 2004. С. 29-33.
15. Тиняков Г.Г., Тиняков В.Г. Микроструктура молока и молочных продуктов. М.: Пищевая промышленность, 1972. С 37-39.