УДК 637.1:66.022.393

О.В. Мудрикова, П.В. Митрохин

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ДЕТЕРГЕНТОВ НА БЕЛКИ МОЛОКА

Исследовано влияние мочевины на процессы денатурации белковых фракций молока и молочных продуктов. Подобраны условия для оценки степени денатурации белков молока.

Молоко, молочный продукт, мочевина, детергент, денатурация.

В опытах на белках в зависимости от природы денатурирующего воздействия и его интенсивности, а также структуры белка можно наблюдать различные денатурационные состояния белка, отличающиеся друг от друга рядом свойств. Для некоторых белков известны изомерные состояния, которые возникают при обработке мягкими денатурирующими агентами. Эти изоморфные формы можно считать начальными стадиями денатурации, они сравнительно легко обратимы при снятии действия денатурата [1].

Агрегация является процессом, закрепляющим денатурированное состояние молекул и препятствующим более полному прохождению ренатурации. В агрегации денатурированных молекул принимают участие те же связи, которые стабилизируют нативную структуру глобулярных белков: гидрофобные, водородные, солевые и в некоторых случаях дисульфидные.

Денатурирующие факторы условно можно разделить на 3 группы: физические (температура, давление, силы поверхностного натяжения, ультразвук, лучистая энергия, механические воздействия), химические (ионы водорода и гидроксила, органические растворители, амиды и их производные, детергенты и др.) и биологические (ферменты) [1].

В большинстве случаев денатурация осуществляется в водных растворах. Молекулы воды могут образовывать и расщеплять водородные связи в белках, конкурируя с водородными связями в полипептидных цепях. Особенно велико участие молекул воды в тепловой денатурации. При нагревании водных растворов белка происходит разрушение слабостабилизируемых структур с заменой внутренних водородных связей на внешние с водой. Считается, что в некоторых случаях молекулы воды могут перестраивать структуру белка даже при комнатной температуре.

Механизм тепловой денатурации объясняется сравнительно просто. С увеличением температуры тепловая энергия в расчете на степень свободы может стать выше энергии нековалентных связей в нативной структуре белка, что приводит к разрыву этих связей. Новая конфигурация полипептидных цепей обладает более низкой свободной энергией для системы белок – окружающая среда [2]. С повышением температуры уменьшается степень гидратации белковых молекул, что также приводит к ослаблению прочности глобулы.

Денатураты, такие как мочевина и близкие к ней вещества, обладают значительно большей способностью к расщеплению водородных связей, чем вода. Помимо этого, мочевина является полярным соединением и приводит к повышению диэлектрической постоянной воды, ослабляя электростатические (солевые) связи. В растворах мочевины развертывание молекул обусловлено уменьшением гидрофобных сил. Это связано с тем, что в растворах мочевины неполярные группы полипептидных цепей будут находиться в энергетически менее выгодном окружении, чем в водных растворителях. Считают также, что денатурирующее действие мочевины связано с уменьшением коэффициента активности пептидных групп, а также с катионной природой этого соединения [1].

При использовании мочевины в качестве денатуратов удобно наблюдать за первыми фазами денатурации, минуя постденатурационные процессы. Степень и обратимость денатурации зависят от природы белка и концентрации мочевины, поэтому при выборе этой концентрации иногда приходится искать компромисс между опасностью агрегации белков и угрозой их необратимой денатурации [2].

В молекулах глобулярных белков в нативном состоянии большинство гидрофобных боковых радикалов аминокислотных остатков «утоплено» внутрь глобулы, на поверхности же располагаются полярные (гидрофильные группы). При развертывании полипептидной цепи обнажаются неполярные радикалы, что сопровождается уменьшением растворимости и увеличением способности к межмолекулярному взаимодействию, т.е. агрегации, которая может сопровождаться коагуляцией денатурированного белка, выпадением его в осадок.

Помимо освобождения гидрофобных групп, при денатурации освобождаются и полярные группы, маскированные ранее, освобождаются целые звенья пептидных цепей с пептидными связями, дисульфидными мостиками и т.д. Известно, что при денатурации глобулярных белков наблюдается увеличение количества некоторых реактивных групп, которые были недоступны для модификаций в молекуле белка в нативной форме.

Развертывание полипептидной цепи при денатурации глобулярных белков приводит к изменению физико-химических свойств: вязкости, седиментации, диффузии. Оптические свойства меняются. Особенно изменяются дифференциальные спектры в ультрафиолетовой области, оптическое вращение и дисперсия

оптического вращения, двойное лучепреломление в потоке и светорассеяние, которые характеризуют главным образом размер и форму частиц, поэтому в большей степени будут обусловливаться постденатурационной агрегацией частиц [1].

Процессы денатурации многих белков уже подробно изучены в мировой практике, однако белковые фракции молока как объект исследования не рассматривались. Мы в качестве объектов исследования использовали пастеризованное цельное молоко и пастеризованное восстановленное молоко. Сывороточные белки являются наиболее термолабильной частью белков молока – в процессе пастеризации они подвергаются сравнительно глубоким изменениям. Сначала происходит их денатурация, то есть конформационные изменения белковых молекул с нарушением третичной и вторичной структур, в результате которых компактно свернутая молекула превращается в беспорядочный клубок; далее наступает агрегация денатурированных частиц за счет взаимодействия сульфгидрильных групп.

Денатурация большинства сывороточных белков молока начинается при сравнительно низких температурах нагревания – в интервале 62–78 °С. Степень денатурации (и агрегации) белков зависит от температуры, продолжительности ее воздействия на молоко и pH раствора. Потери растворимости сывороточных белков молока при различных видах тепловой обработки представлены в табл. 1.

Таблица 1

Потери растворимости сывороточных белков молока при различных видах тепловой обработки

Вид тепловой обработки	Потери, %
Пастеризация: 72–74 °С, выдержка 15–20 с	9
85 °С, выдержка 8–10 с	22–30
Стерилизация в бутылках	78–100
УВТ-обработка: пароконтактный нагрев	40–60
косвенный нагрев	75–80

Из сывороточных белков наиболее термолабильны иммуноглобулины и сывороточный альбумин. β-лактоглобулин и α-лактальбумин относятся к более термостабильным белкам. Так, денатурация β-лактоглобулина происходит при нагревании молока до 78 °С, а α-лактальбумина – при 62 °С и выше, правда, оба белка характеризуются способностью к ренатурации, особенно последний белок [3].

В результате структурных изменений, вызванных денатурацией, в молекулах белка освобождаются ранее «скрытые» функциональные группы: сульфгидрильные группы цистеина, ε-аминогруппы лизина, гидроксильные группы серина и др. Вследствие освобождения сульфгидрильных групп и выделения из них сероводорода молоко приобретает вкус кипяченого продукта или привкус пастеризации. В результате взаимодействия реакционноспособных групп наступает агрегация денатурированных белков, т.е. степень их дисперсности уменьшается: нативный белок → денатурированный белок → агрегированный белок.

При высоких температурах тепловой обработки денатурированный β-лактоглобулин помимо агрегации комплексуется с α-лактальбумином и с γ-казеином мицелл казеина. Образование комплекса β-лактоглобулин – γ-казеин снижает термоустойчивость казеина.

Казеин в отличие от обычных глобулярных белков является очень термоустойчивым белком – для его коагуляции необходима выдержка молока при температуре 130 °С в течение от 2 до 88 мин [3].

При производстве сухого молока денатурационные процессы в белках протекают глубже вследствие неоднократной тепловой обработки. Таким образом, при воздействии мочевины на молоко различной степени тепловой обработки будет происходить денатурация белка с разной интенсивностью. Так, в восстановленном молоке большая часть белков проденатурировала и потеряла реактивные группы, которые могли способствовать дальнейшей агрегации. Еще одна часть белков в таком молоке уже агрегировала, эти молекулы также не будут участвовать в процессе.

Пастеризацию цельного и восстановленного молока проводили в лабораторных условиях. В кипящую воду опускали пробирку с молоком, таким образом, нагревание молока до температуры пастеризации происходит очень быстро. Одновременно, в течение всего процесса, замеряли температуру образцов. Пастеризацию проводили при 85 °С с выдержкой 10 с.

Содержание общего белка в образцах проводили по методу Дюма, основанному на измерении теплопроводности молекулярного азота, образующегося после сжигания анализируемого образца при температуре около 1000 ºС в атмосфере кислорода и последующего восстановления всех образующихся оксидов азота при помощи восстанавливающего агента с использованием анализатора белкового азота RAPID N Cube (Elementar, Германия). Количество общего белка составило 3,28 г/100 мл продукта в пастеризованном цельном молоке и 3,31 г/100 мл продукта в пастеризованном восстановленном.

Были подготовлены образцы с различным содержанием пастеризованного цельного молока: 100 %, 50 %, 0 %. К исследуемым образцам добавляли растворы мочевины в соотношении 3:1. Количество добавляемого детергента выбрано экспериментально. Для выбора рабочей концентрации мочевины были использованы следующие растворы: 2М, 4М, 6М, 8М и 9М. Оценку степени протекания денатурации проводили на фотометре фотоэлектрическом КФК-3-01 при λ = 315 нм, ширина кюветы 1 см.

Графическая зависимость величины оптической плотности образцов от концентрации рабочего раствора детергента представлена на рис. 1. В образце цельного пастеризованного молока величина оптической плотности изменяется от 2,170 до 1,992 при концентрациях раствора детергента от

2М до 8М, в смеси пастеризованных цельного и восстановленного молока (1:1) – от 2,072 до 1,671, в восстановленном молоке – от 1,936 до 0,756 соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации мочевины приводит к агрегации белков. Таким образом, концентрация раствора мочевины, равная 8М, обеспечивает наиболее полную денатурацию белковых молекул молока, вызванную присутствием детергента.

Причем при увеличении в образцах количества ранее проденатурированных белков молока в процессе сушки и пастеризации наблюдается закономерное снижение степени денатурации. При концентрации мочевины 2М величина оптической плотности снижается от 2,170 для пастеризованного цельного молока до 1,936 для пастеризованного восстановленного молока, при концентрации 4М – от 1,974 до 1,532, при концентрации 6М – от 2,008 до 1,014, при концентрации 8М – от 1,990 до 0,756 соответственно.

Разница в величинах оптической плотности в объектах исследования при увеличении количества ранее проденатурированных белков при использовании концентрации 2М составляет 0,234, при 4М – 0,442, при 6М – 0,994, при 8М – 1,234 соответственно. Следовательно, так как 8М раствор мочевины обеспечивает наибольшую разницу в величинах оптической плотности при сравнении объектов различной степени термообработки, его можно использовать для количественного определения восстановленного молока в питьевом.

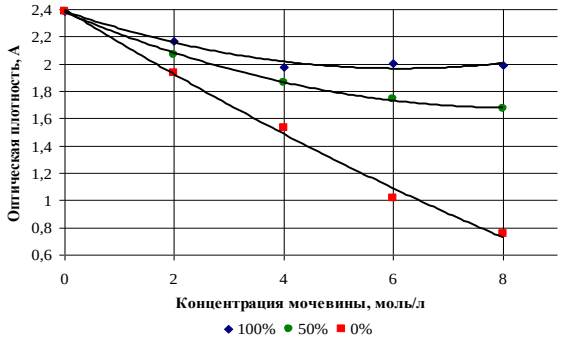

Рис. 1. Зависимость величины оптической плотности образцов от концентрации рабочего раствора мочевины

Также для оценки степени денатурации белков в исследуемых образцах была проведена серия экспериментов с наложением влияний различных денатурирующих факторов. Образцы после добавления мочевины помещались в термостат при различных температурах и выдерживались в течение 10 мин. Результаты представлены в табл. 2.

Таким образом, из табл. 2 следует, что увеличение температуры в образцах не приводит к существенному увеличению оптической плотности, а следовательно, выбранный детергент экспериментально обоснованной концентрации обеспечивает наибольшую степень денатурации белков молока.

Дальнейшая работа была направлена на изучение влияния мочевины на количественное содержание фракций в молоке. Для этого образцы пастеризованных цельного и восстановленного молока после проведения денатурации 8М раствором мочевины центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 об/мин на CENTRIFUGE CM-50. Такие жесткие условия приводят к агрегации белковых молекул. Содержание общего белка в супернатантах составило 0,175 и 0,184 г/100 мл продукта соответственно.

Таблица 2

Величина оптической плотности в образцах с 8М мочевиной при различных температурах

Температура, °С	Содержание пастеризованного цельного молока, %		
	100	50	0
25	1,990	1,671	0,756
50	1,993	1,672	0,760
100	1,994	1,676	0,762

Молекулярно-массовое распределение белков оценивали с помощью белкового электрофореза методом Лэмли [4]. В ходе исследования использовали ячейку для электрофореза PROTEAN II xi. Для разделения белка использовали денатурирующий полиакриламидный гель (12 % разделяющий и 4 % фокусирующий) с 0,1 % додецилсульфатом натрия. Электрофорез проводили на однократном электродном буфере с добавлением 0,1 % додецилсульфата натрия при 15 мА. Гель окрашивали 0,2 % Coomasie Brilliant Blue R250, красителем, приготовленным на ледяной уксусной кислоте, при повышенной температуре в течение 7–10 мин, затем трижды отмывали дистиллированной водой.

Визуализацию результатов проводили на УФ-трансиллюминаторе TCP-20M (Vilber Lourmat, США). Обработку данных осуществляли с помощью гель-документирующей системы Doc-It LS (версия 6). Результаты проведения электрофореза в образцах пастеризованных цельного и восстановленного молока, а также в супернатанте после удаления проденатурированных в 8М растворе мочевины белков представлены в табл. 3.

Таблица 3

Молекулярно-массовое распределение белков в молоке различного вида и в супернатанте

Образец		Пастеризованное цельное молоко		Пастеризованное восстановленное молоко	
		до	после	до	после
Общий белок, г/100 мл продукта		3,28	0,175	3,31	0,184
% от общего содержания белков	лактоферрин	2,28	–	–	–
	сывороточный альбумин	1,58	–	–	–
	αs_1-казеин	32,61	61,24	53,93	61,56
	β-казеин	30,16	38,76	29,27	38,44
	αs_2-казеин	11,14	–	8,67	–
	к-казеин	9,24	–	–	–
	β-лактоглобулин	11,14	–	8,13	–
	α-лактальбулин	1,85	–	–	–

Таким образом, содержание общего белка в супернатанте после удаления проденатурированных 8М раствором мочевины белков для пастеризованных цельного и восстановленного молока составляет приблизительно 5,4 %. Фракционный состав представлен двумя видами белков: αs_1-казеин и β-казеин, причем относительное содержание белков от общего содержания одинаковое. Следовательно, использование мочевины не оказывает влияния на фракционный состав белков молока. Присутствие мочевины сказывается только на процессе денатурации белков разной степени термической обработки.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что по определению степени денатурации белков молока можно судить о наличии восстановленного молока в питьевом. В перспективе эти данные позволят разработать методику количественного определения содержания восстановленного молока в питьевом.

Список литературы

1. Hafiz, A. Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization / Ahmed Hafiz. – CRC Press LLC, 2005. – P. 389.

2. Simon, R. Protein purification techniques / Roe Simon. – Oxford University Press, 2001. – P. 244.

3. Горбатова, К.К. Химия и физика молока: учебник для вузов / К.К. Горбатова. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 288 с.

4. Okajima, T. Non-urea sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with high molarity buffers for the separation of proteins and peptides / T. Okajima, T. Tanabe, T. Yasude // Anal. Biochem. – 1993. – P. 211–213.

ООО «Инновационно-исследовательский центр»,
650021, Россия, г. Кемерово, ул. Красноармейская, 8.
Тел./факс: (3842) 33-12-57

SUMMARY

O.V. Mudrikova, P.V. Mitrohin

The investigation of detergents influence on milk proteins

The influence of urea on the processes of denaturation of the protein fractions of milk and dairy products has been studied. The conditions for evaluating the degree of milk protein denaturation have been established.

Milk, dairy products, urea, detergent, denaturation.