УДК 637.147.2:66.093.8

М.Г. Курбанова, Г.А. Аветисян

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СТЕПЕНИ ГИДРОЛИЗА К-КАЗЕИНА НА ХАРАКТЕРИСТИКИ ГЕЛЕЙ

В экспериментальных исследованиях, основанных на изучении сычужной свертываемости белков молока, предлагается изменить мицеллярную реактивность с помощью протеолитического фермента – химозина. Для торможения процесса гидролиза применяли ингибитор ферментативных реакций, в частности пепстатин А. Из молока были получены образцы гелей с различной степенью гидролиза к-казеина, в которых исследовали физико-химические и реологические характеристики в сравнении с традиционными кислотными и сычужными сгустками.

Степень гидролиза, к-казеин, реологические свойства, гликомакропептид, влагоудерживающая способность, ингибитор, сычужный фермент.

С целью изменения функциональных свойств молочных белков используют различные модификации химического и ферментативного гидролиза. При этом получают новые сведения о сопутствующих механизмах протекающих реакций. Процесс ферментативного гидролиза казеина можно рассмотреть как способ изменения количества полярных групп, его гидрофильности или гидрофобности, а также молекулярных конфигураций, ведущих к изменениям их функциональности.

Преобразование молока в гель под действием протеазы (в данном случае химозина) является результатом трансформации к-казеина.

Действие химозина влияет на деление макропептидов казеина, за которыми следует процесс агрегации мицелл пара-к-казеина.

Сычужная коагуляция носит необратимый характер и включает две стадии: ферментативную и коагуляционную. На первой стадии под действием основного компонента сычужного фермента – химозина – происходит разрыв пептидной связи фенилаланина (в положении 105) и метионина (в положении 106) в полипептидных цепях к-казеина казеинаткальцийфосфатного комплекса (ККФК). В результате протеолиза молекулы к-казеина распадаются на гидрофобный пара-к-казеин и гидрофильный гликомакропептид. Гликомакропептиды имеют высокий отрицательный заряд и обладают сильными гидрофильными свойствами. При их отщеплении частично разрушается гидратная оболочка, силы электростатического отталкивания между частицами уменьшаются и дисперсная система теряет устойчивость [2].

На второй стадии дестабилизированные мицеллы казеина (параказеина) собираются в агрегаты и образуется сгусток, т.е. происходит процесс гелеобразования. Это особенное видоизменение структуры белков положило начало циклу последовательных стадий в явлении гелеобразования при традиционной технологии производства сыров.

Цель исследований. Изучение влияния различной степени гидролиза белков молока в результате изменения реактивности мицеллярной поверхности к-казеина на характеристики молочных гелей.

Материалы и методы. Для проведения исследований использовали следующие сырье и материалы: молоко сухое обезжиренное (ГОСТ 23621-79), вода питьевая (ГОСТ Р 51232-98), хлорид кальция (ГОСТ 27025-86), сычужный фермент (химозин), натриевая соль азотоводородной кислоты (азид натрия), регулятор кислотности – глюконо-дельта лактон (Е575) (ГОСТ Р 53045-2008), пепстатин А, диметилсульфоксид (ДМСО).

В ходе проведения исследований обезжиренное молоко с массовой долей влаги 4 % восстанавливали до содержания сухих веществ 12 %, оставляли на созревание при температуре 4–6 ^{0}С в течение 10–11 ч. Для предотвращения роста бактерий в восстановленное молоко вносили азид натрия в количестве 0,05 %. Для улучшения свертываемости в восстановленное, созревшее молоко вносили хлорид кальция из расчета 250 мг/л.

Исследуемые образцы молока подвергали частичному гидролизу при температуре (4±1) ^{0}С, используя подготовленный раствор химозина из расчета 600 мг/л, разбавленного в 10-кратном количестве воды, в соотношении 10, 20 и 30 µl (ммоль) на 100 мл молока, чтобы молярный коэффициент ферментного субстрата (E/S) составил 6, 18 и 36×10^{-7} соответственно (субстратом являлся рассматриваемый к-казеин). Процесс гидролиза длился 15 ч, далее для прекращения процесса при интенсивном перемешивании вносили в качестве ингибитора ферментации пепстатин А, который является специфическим ингибитором для протеиназ, таких как химозин, растворенный в диметилсульфоксиде с концентрацией 1 ммоль. Для полного прекращения протекания реакции ферментативного гидролиза количество пепстатина А потребовалось в таком соотношении, чтобы молярный коэффициент фермент/ингибитор составил $0{,}2\times10^{-4}$ [1].

Контрольные сычужные сгустки (гели) получали внесением в 100 мл обезжиренного молока препарата химозина в количестве 40 µl и инкубированием смеси при температуре 30±1 ^{0}С в

течение 40–60 мин. Кислотные гели (сгустки) получали в аналогичных условиях путем внесения в 100 мл обезжиренного молока 0,1 Н раствора молочной кислоты. Для контроля протекающей реакции использовали ингибитор протеаз, который добавляли в молоко, при достижении желаемого уровня гидролиза к-казеина. Уровень ферментативных изменений связан со степенью гидролиза к-казеина, который можно контролировать при низких положительных температурах инкубации 4±1 ^{0}С. В таких условиях две реакции подразумевают ферментативный гидролиз с расщеплением макропептидов казеина и последующим агрегированием расцепленных мицелл параказеина.

Степень гидролиза к-казеина определяли методом катионно-обменного хроматогафического анализа. Контролировали реологические характеристики и влагоудерживающую способность исследуемых образцов гидролизатов к-казеина, полученных путем частичного гидролиза; полученные результаты сопоставляли с контрольными образцами.

Динамику реологических измерений проводили на реометре (марки Rheostress RS 100) с измерительной системой, состоящей из конус-пластины (диаметром 60 мм и углом 2^0) и датчика системы. Измерения сохранения модуля (G^1), а также потери модуля (G^{11}) проводили в колебательном режиме молочных гелей. Частота колебаний составляла 0,1 Гц, а интервал измерений составил 120 с при давлении 0,02 Па. Продолжительность гелеобразования (tg) определяли как время, когда $G^1 = G^{11}$.

Результаты исследования и их обсуждение. Частичный гидролиз мицелл к-казеина получали путем внесения в молоко низких концентраций химозина (примерно в 10 раз меньше, чем используют для получения традиционных молочных сычужных гелей) при низкой положительной температуре с целью замедления скорости гидролиза к-казеина и более эффективного контроля ферментативной реакции торможения. С другой стороны, из литературных источников известно, что процесс агрегирования мицелл к-казеина не наступает при температурах ниже 15 ^{0}С [2].

После выдерживания исследуемых образцов с различными концентрациями химозина в течение 15 ч в них добавляли рассчитанное количество раствора ингибитора ферментации, в итоге степень гидролиза к-казеина составила 20, 35 и 50 % (табл. 1).

Таблица 1

Влияние концентрации протеазы и ингибитора на степень гидролиза к-казеина

Концентрация химозина, М	Концентрация пепстатина А, М	Степень гидролиза, %
$0{,}02\cdot10^{-8}$	$0{,}1\cdot10^{-4}$	20
$0{,}04\cdot10^{-8}$	$0{,}2\cdot10^{-4}$	35
$0{,}06\cdot10^{-8}$	$0{,}3\cdot10^{-4}$	50

Эффективность торможения гидролиза была проверена дополнительно. Для этого испытуемые образцы после внесения пепстатина А инкубировали при температуре 32 ^{0}С в течение 24 ч и анализировали размер частиц макропептидов. Исследования показали, что при молярном коэффициенте фермент/ингибитор (Е/I) $0{,}2\times10^{-4}$ наблюдалось полное подавление реакции гидролиза.

В опытных образцах были отмечены такие показатели, как время гелеобразования и активная кислотность полученных гелей в зависимости от степени гидролиза к-казеина (табл. 2).

Таблица 2

Влияние степени гидролиза к-казеина на формирование гелей

Степень гидролиза, %	Продолжительность гелеобразования, мин	pH геля
20	43±2	5,36±0,02
35	25±2	5,47±0,02
50	18±2	5,66±0,02

Величина активной кислотности повлияла на процесс гелеобразования ферментативного гидролизата молочного белка. С повышением степени гидролиза к-казеина активная кислотность геля увеличивалась. Это можно интерпретировать как сдвиг баланса в сторону гидрофобных взаимодействий мицелл казеина, что повлекло за собой агрегацию молекул. Сокращение электростерического отталкивания в результате частичного гидролиза к-казеина может быть увеличено путем снижения активной кислотности, которое могло повлечь изменение стерически стабилизирующего потенциала слоя макропептидов, что указывает на сокращение их доли во время свертывания молока. Снижение pH геля может также поддержать эту гипотезу. Необходимо отметить, что добавление пепстатина А не повлияло на pH молочных гелей.

В процессе экспериментальных исследований параллельно рассматривали реологические характеристики полученных молочных гелей с частично преобразованными мицеллами казеина (полученными в результате неполного гидролиза к-казеина на 20, 35 и 50 %), сравнивая их с структурными свойствами кислотных и сычужных гелей. В качестве контрольных образцов использовали гели, полученные при добавлении в молоко температурой 30±1 ^{0}С сычужного фермента, в состав которого входит 60 % химозина и 40 % говяжьего пепсина. Было выявлено, что внесение регулятора кислотности – глюконо-дельта лактона (Е575) в молоко с целью регулирования значения активной кислотности, при которой работает фермент, повлияло на формирование и старение гелей с частичным гидролизом к-казеина. Продолжительность отвердевания геля увеличивалась с повышением уровня гидролиза.

В ходе эксперимента для изучения реологических характеристик были подобраны

низкие амплитудные колебания с целью контроля образования молочных гелей в процессе гидролиза.

Наряду с реологическими характеристиками немаловажное значение имеет и влагоудерживающая способность (ВУС) полученных гелей (рис. 1).

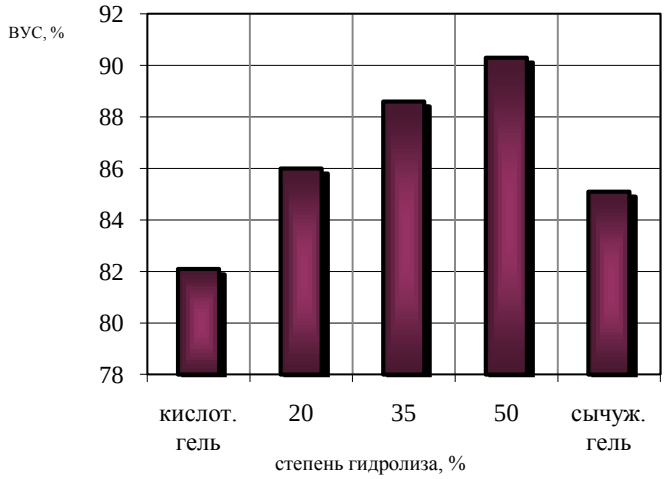

Рис. 1. Влагоудерживающая способность гелей

Влагоудерживающую способность полученных гелей в результате частичного гидролиза к-казеина сравнивали с ВУС кислотных и сычужных гелей. Измерения проводили через 120 мин после образования гелей. Анализ результатов показал, что образцы гелей со степенью гидролиза 35 и 50 % обладали высокой способностью удерживать сыворотку, их ВУС варьировала в пределах 88–90 %, тогда как у кислотного и сычужного геля (контрольных образцов) этот показатель варьировал в пределах 82 и 85 % соответственно. Таким образом, гели с частичным гидролизом к-казеина способны лучше удерживать влагу, чем образцы сгустков, полученные кислотной коагуляцией белков молока.

В целом большинство реологических параметров, характеризующих молочные гели, зависят от количества и прочности связей между частицами казеина, а также его структуры и пространственного распределения нитей, входящих в состав этих частиц.

Выводы. Результаты, полученные в рамках этих исследований, свидетельствуют о том, что возможно изменить реологические и влагоудерживающие характеристики молочных гелей, изменив реактивность мицеллярной поверхности в процессе регулирования гидролиза к-казеина.

Несмотря на то что применение пепстатина А во время гелеобразования при производстве сыров является затруднительным, образование кислотных гелей с необходимой степенью гидролиза белков молока приносит новую информацию для дальнейших исследований в области изменения химических взаимодействий в процессе формирования молочных гелей. Однако для применения на практике, в производственных условиях необходимы дополнительные исследования в поиске других путей приостановления процесса ферментации с подходящей тепловой обработкой.

Список литературы

1. Антонов, В.К. Химия протеолиза / В.К. Антонов. – М.: Наука, 1991. – 504 с.

2. Горбатова, К.К. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов / К.К. Горбатова. – М.: ГИОРД, 2003. – 352 с.

3. Круглик, В.И. Теоретическое обоснование и практическая реализация технологий гидролизатов молочных белков и специализированных продуктов с их использованием: автореф. дис. … д-ра техн. наук: 05.18.04: защищена 19.02.08 / Круглик Владимир Иванович. – Кемерово, 2008. – 43 с.

ФГОУ ВПО «Кемеровский государственный сельскохозяйственный институт»,
650056, Россия, г. Кемерово, ул. Марковцева, 5.
Тел./факс: (3842) 73-40-23

SUMMARY

M.G. Kurbanova, G.A. Avetisyan

Research of influence of κ-casein hydrolysis degree on gels properties

In the experimental methods of research, based on rennet coagulability of milk proteins, it is suggested to modify micellar reactivity using the proteolytic enzyme himozin. To inhibit hydrolysis the inhibitor of enzymatic reactions pepstatin A has been applied. The gel samples with different degrees of κ-casein hydrolysis have been obtained. Their physico-chemical and rheological characteristics have been studied in comparison with traditional acid and rennet clots.

Degree of κ-casein hydrolysis, rheological properties, glikomakropeptid, water-holding capacity, inhibitor, rennet enzyme.