

4. Allison, C. Rice-ficht good or bad bruccellavaccine // Its Allin Delivery Brucellosis Int. Research Con. 2001. – P. 15.
- 5.Charg, H. Comparison of adjuvant efficacy of chitosan and aluminum hydroxide for intraperitoneally administered inactivated influenza H5N1 vaccine / H.Chang., X. Li., Y. Teng et al. // DNA Cekk Biol. – 2010 – No 29 (9). – P. 563-568.
- 6.Okawa Y., Kobayashi M., Comparative study of protective effects of chitin, chitosan, and N-acetyl chitohexoose against Pseudomonas aeruginosa and Listeria monocytogenes infections in mice Biol Pharm Bull. 2003 Jun; 26(6).-P. 902-904;

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КАЗЕИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИТОЗАНА

Алиева Л.Р.¹, Евдокимов И.А.¹, Варламов В.П.², Тихонов В.Е.³,
Буткевич Т.В.⁴, Курченко В.П.⁴

¹Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биоинженерии, г. Москва,

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, г. Москва

⁴Белорусский государственный университет, г. Минск, kurchenko@tut.by

Предложена технология получения казеина и сывороточных белков с использованием хитозана из обезжиренного молока. Показано, что при рН 6,3 происходит коагуляция мицелл казеинов и сывороточных белков с положительно заряженными молекулами хитозана с молекулярными массами 47 кДа, 25,4 кДа, 7,7 кДа. В результате ионного взаимодействия хитозана с белками обезжиренного молока достигается 90 - 92% выход целевого продукта. В его состав кроме незначительного количества хитозана входят все формы казеинов: α_S -казеин, β -казеин, κ -казеин, а также значительное количество β -лактоглобулина и α -лактальбумина.

Введение. Для производства казеина используется два типа технологий: сычужный казеин, получаемый ферментативным осаждением и кислотный казеин, получаемый подкислением обезжиренного молока до изоэлектрической точки белка - рI 4,6. Основываясь на физико-химических свойствах казеина и хитозана, возможна разработка альтернативной технологии выделения казеина из обезжиренного молока [1, 2].

Основой такой технологии являются свойства фракций казеинов и хитозана. В молоке коров содержится шесть главных белков: α_{S1} -казеин, α_{S2} -казеин, β -казеин, κ -казеин, β -лактоглобулин и α -лактальбумин. Казеины составляют 78-85% от всех белков молока. Исследование фракционного состава казеина позволило выявить фракции: α , β , κ , γ . Они представляют собой комплекс основных и минорных фракций, включая генетические варианты. Казеины являются фосфопротеидами, а κ -казеин относится к

фосфогликопротеидам. В отличие от сывороточных белков они характеризуются высокой термоустойчивостью и выдерживают кипячение в течение нескольких часов. В казеине содержание группы α_S -казеинов составляет 43-55%, β -казеин 24-35%, κ -казеин 8-15%, γ -казеинов – фрагментов β -фракции 3-7%. Они относятся к группе сферопротеинов. Первичная структура α_{S1} -, α_{S2} -, β - и κ -казеина имеет невысокую гомологию. Все фракции казеинов имеют близкие изоэлектрические точки в области рН4,6 [2 - 5].

Фракция α_{S1} -казеинов, состоит из полипептидной цепи, содержащей 199 аминокислотных остатков, включающей 8 остатков фосфорной кислоты. Она не содержит цистеин и имеет повышенное содержание аспарагиновой кислоты, лизина и тирозина. Эта фракция осаждается под действием ионов кальция, являясь кальцийнеустойчивой.

В α_{S2} -казеине содержится 207 аминокислотных остатков. Он имеет четыре генетических варианта, которые отличаются содержанием от 10 до 13 фосфосериновых остатков, содержат два остатка цистеина и осаждается под действием ионов кальция [2, 6].

Полипептидная цепь β -казеина представлена 209 аминокислотными остатками, которые содержат пять остатков фосфорной кислоты. Он имеет семь генетических вариантов. Фракция характеризуется повышенным содержанием валина, лейцина, пролина, содержит меньше аланина и аспарагиновой кислоты при отсутствии цистеина. Осаждение β -казеина происходит в присутствии ионов кальция при температуре 35°C, в то время как при 4°C в охлажденном состоянии он не чувствителен к действию этих ионов. При низких температурах β -казеин растворим и без нарушения мицелл казеина может в значительных количествах переходить в плазму молока, где под действием плазмина происходит его частичный протеолиз с образованием γ -казеинов. Особенностью γ -казеинов является то, что под действием сычужного фермента белки этой фракции не осаждаются и уходят в сыворотку. Увеличение содержания γ -казеинов в молоке снижает степень использования белков в основу технологии которых положено сычужное свертывание белков: сычужные сыры, казеин сычужный, отдельные виды творога. Способность β -казеина и α_S -казеинов осаждаться при действии сычужного фермента в присутствии ионов кальция лежит в основе технологии производства сычужных сыров и казеина [1, 2, 4, 6, 7].

Главный компонент κ -казеина представлен полипептидной цепью, состоящей из 169 аминокислотных остатков, в том числе двух цистеиновых. В отличие от α_S - и β -казеинов κ -казеин содержит только один фосфосериновый остаток, поэтому практически не связывает ионы кальция, благодаря чему не теряет растворимости в их присутствии, являясь кальцийустойчивой фракцией белков молока. Растворимость κ -казеина также связана с присутствием в его структуре N-ацетилгалактозамина, галактозы и

N-ацетилнейраминовой кислоты, которые содержат большое количество лиофильных ОН-групп. Этот фосфогликопротеид характеризуется высоким отрицательным зарядом. При ассоциации с α_S - и β -казеинами к-казеин образует стабильные мицеллы и, располагаясь большей частью на поверхности последних, выполняет роль защитного коллоида по отношению к этим кальцийнеустойчивым фракциям [2, 4, 8].

Молекулы α_{S1} -, β - и к-казеинов имеют малоупорядоченную структуру за счет незначительного количества α -спиральных участков составляющих от 1 до 6%. Также большинство форм казеина характеризуются невыраженной третичной структурой, лишенной дисульфидных мостиков [2, 4, 6, 8]. Казеины формируют четвертичную структуру образуя непрочно связанные друг с другом мицеллы. Мицелла казеина состоит из субмицелл диаметром 10-20 нм. В состав субмицелл входят α_{S1} -, α_{S2} -, β - и к-казеины в соотношении 3:1:3:1. В мицелле казеинов выделяют центральную гидрофобную и периферическую гидрофильную области, в которой располагаются основные сайты фосфорилирования. В мицеллах казеинов связь между субмицеллами осуществляется через кальций-фосфатные мостики. Они располагаются таким образом, что гидрофобные участки фракций находятся внутри ядра, а гидрофильные участки к-казеина и фосфатные группы α_{S1} -, α_{S2} -и β -казеинов – на поверхности (рисунок 1). Так как фракции казеина являются фосфопротеидами, то в присутствии кальция, цитратов и фосфатов склонны самоассоциироваться и взаимодействовать друг с другом с образованием ассоциатов различных размеров. Электронномикроскопическими исследованиями установлено, что мицеллы имеют сферическую форму с диаметром от 40 до 300 нм и являются высокоорганизованными структурными единицами со средней молекулярной массой $6 \cdot 10^8$ Да [4, 6-9].

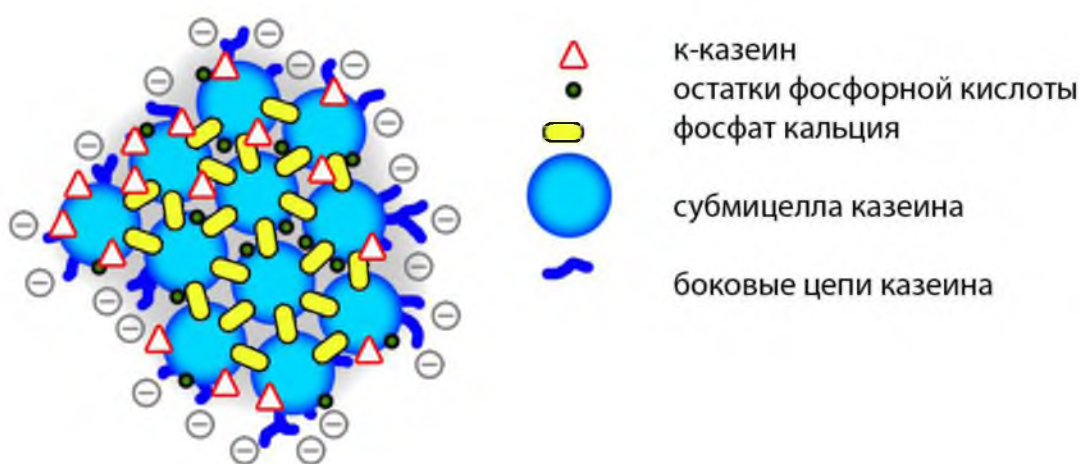


Рисунок 1 – Строение мицеллы казеина

Между фракциями казеина могут возникать связи различных типов: гидрофобные взаимодействия, ионные и водородные. Поверхность мицеллы

казеина за счет электростатического взаимодействия связывает значительное количество диполей воды. По мере утолщения слоя связанной воды новые ее молекулы все слабее удерживаются коллоидной частицей. Способность казеинов к ассоциации зависит от температуры, рН и ионной силы. При снижении в молоке величины рН ионы водорода связываются с ионизированными карбоксильными группами казеинов и число отрицательных зарядов на поверхности белковых частиц уменьшается. Потеря отрицательного заряда мицеллами казеинов ведет к нарушению гидратной оболочки и к снижению растворимости белка. При достижении величины рН близкой к изоэлектрической точке 4,6 казеины выпадают в осадок. На основании данных свойств получают кислотный казеин, путем подкисления обезжиренного молока до изоэлектрической точки [3, 4, 6-11].

Также фактором, влияющим на растворимость белков, является ионная сила, а именно концентрация солей кальция и магния в системе. При невысокой концентрации солей растворимость белков высокая. Белки адсорбируют ионы кальция и магния на своей поверхности, за счет чего повышается их суммарный заряд и упрочняются гидратные оболочки. При создании высоких концентраций солей происходит противоположное действие. Ионы кальция и магния конкурируют за связывание с казеиновыми частицами и вследствие повышенной плотности заряда снижается связывание воды. Лишенные гидратной оболочки белки образуют агрегаты и выпадают в осадок [9, 12].

Температурный фактор также играет большую роль в ассоциации белковых молекул. Тепловая обработка вызывает конформационные изменения в полипептидных цепях сывороточных белков после чего они образуют комплексы друг с другом (β -лактоглобулин – α -лактальбумин), которые способны взаимодействовать с казеиновыми мицеллами. Результатом такого взаимодействия является увеличение заряженной поверхности казеиновых мицелл и усиление их гидратационных свойств. Так как казеины относятся к термостабильной фракции белков молока, то при пастеризации (до 100°C) нарушения структуры казеина не происходит. Изменение структуры и распад мицелл казеина на субмицеллы возможен при нагревании до 120°C в течение 5 ч. Термическая денатурация белков не снижает их пищевой ценности [13].

Эти принципы положены в основу получения сычужного казеина. При воздействии сычужного фермента на поверхностную фракцию мицелл казеина происходит протеолиз к-казеина ведущий к потере отрицательного заряда субмицелл, дестабилизации и агрегации кальцийнеустойчивых α_S - и β -казеинов [1].

К сожалению, традиционные технологии далеки от совершенства. А анализ физико-химических свойств казеинов дает основание предложить новый способ получения казеина из обезжиренного молока. В его основе лежит использование хитозана, который является безвредной для здоровья

пищевой добавкой [14]. Он обладает рядом уникальных химических, физических и биологических свойств, что обуславливает его применение при производстве различных функциональных продуктов питания [15 - 18].

Большой теоретический и практический интерес представляет возможность использования хитозана для выделения белков из молока. Ранее нами показано, что казеины и сывороточные белки эффективно взаимодействуют с хитозаном, образуя коагулят [19 - 23]. Основой этого физико-химического явления служит неравновесное комплексообразование отрицательно заряженных мицелл казеина с катионным полисахаридом - хитозаном, в результате которого происходит образование анизотропных гелей и коацерватов белков [24, 25]. Такой процесс может быть пригоден для переработки обезжиренного молока, в результате которого будет получена белковая масса содержащая казеин и сывороточные белки.

Целью данной работы являлось разработка технологии коагуляции казеинов и белков сыворотки молока с использованием хитозана для получения белковой массы.

Материалы и методы

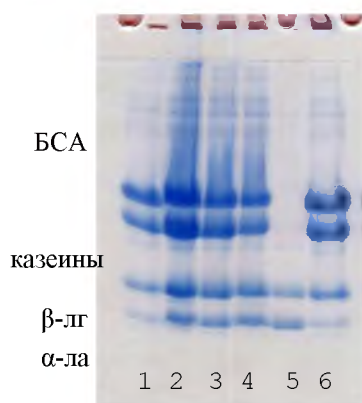
В работе использовали: хитозан с молекулярными массами 47 кДа, 25,4 кДа, 7,7 кДа и олигохитозан любезно предоставленные Варламовым В.П. и Тихоновым В.Е.; сукцинированный хитозан (производство «Биопрогресс», Россия). Молоко обезжиренное производства ОАО «Савушкин продукт».

Для коагуляции белков в молоко добавлялось различное количество хитозана. Образовавшийся коагулят отделяли центрифугированием. Белки молока анализировали с использованием денатурирующего и нативного электрофореза [26].

Результаты и обсуждение

При исследовании механизма взаимодействия хитозана с белками молока нами показано, что этот полисахарид эффективно взаимодействует с казеинами, β -лактоглобулином (β -лг), α -лактоальбумином (α -ла) и бычьим сывороточным альбумином (БСА) [18, 20, 24 - 27]. Такое комплексообразование основано на том, что белки молока характеризуются низкими значениями изоэлектрических точек и при рН 4,8 - 6,2 имеют отрицательный заряд, благодаря чему способны к ионному взаимодействию с положительно заряженными молекулами хитозана. Эффективность комплексообразования белков с хитозаном зависит от рН, ионной силы, концентрации хитозана и его молекулярной массы (рисунки 2, 3, 4). Это явление использовано для разработки технологии получения казеина из обезжиренного молока.

При добавлении к обезжиренному молоку при рН 6,3 раствора хитозана происходило образование коагулята казеинов, сывороточных белков и полисахарида. Состав полученной белковой массы анализировался с использованием денатурирующего электрофореза, результаты которого представлены на рисунке 2.

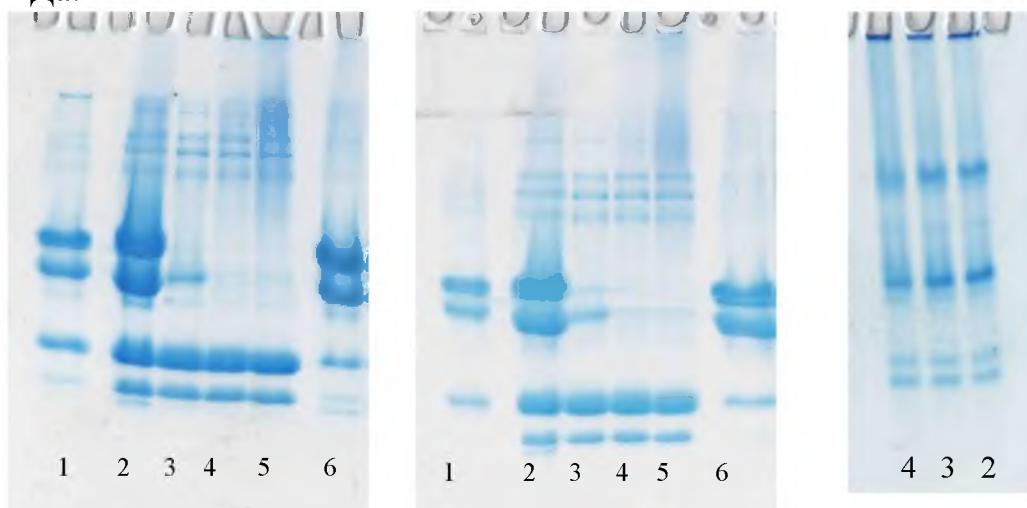


1. Молоко контроль;
2. Молоко с 0,01% раствором хитозана;
3. Молоко с 0,05% раствором хитозана;
4. Молоко с 0,1% раствором хитозана;
5. Молоко с 0,5% раствором хитозана;
6. Молоко с 0,5% раствором хитозана (осадок);

Рисунок 2 – Электрофореграмма белков молока в присутствии различных концентраций хитозана 46,7 кДа (дорожки 2 - 5) и коагулированного осадка белков (дорожка 6)

Анализ полученных результатов свидетельствует, что при температуре 60°C в течении 30 минут происходит эффективное взаимодействие хитозана с молекулярной массой 46,7 кДа в концентрации 0,5% с мицеллами казеинов и белками сыворотки обезжиренного молока.

При добавлении хитозанов с различными молекулярными массами процесс коагуляции мицелл казеина и сывороточных белков молока сохраняется и оптимален при их 0,5 % содержании в обезжиренном молоке. На рисунке 3 представлены электрофореграммы белков молока в присутствии различных концентраций хитозана с молекулярными массами 25,4 кДа, 7,7 кДа и олигохитозана с молекулярной массой около 358,3-716,7 Да.



1. Молоко контроль; 2. Молоко с 0,1% раствором хитозана;
3. Молоко с 0,2% раствором хитозана; 4. Молоко с 0,5% раствором хитозана;
5. Молоко с 1% раствором хитозана; 6. Молоко с 0,5% раствором хитозана (осадок);

Рисунок 3 – Электрофореграмма белков молока в присутствии различных концентраций хитозана 25,4 кДа (А), 7,7 кДа (Б) и олигохитозана (В, нативный электрофорез) (дорожки 2 - 5) и коагулированного осадка белков (дорожка 6)

Анализ результатов свидетельствует, что при рН 6,3 обезжиренного молока происходит коагуляция мицелл казеинов и сывороточных белков с положительно заряженными молекулами хитозана с молекулярными массами 47,6 кДа, 25,4 кДа, 7,7 кДа. Наиболее полное выделение белков происходит при 0,5 % концентрациях хитозана с различными молекулярными массами, при этом наиболее плотный коагулят образуется с хитозаном 47,6 кДа. Низкомолекулярные олигомеры хитозана не образуют коагулят, при этом они взаимодействуют с белками, меняя их электрофоретическую подвижность в нативном электрофорезе (рисунок 3 В). Это свидетельствует об невозможности олигохитозана к многоточечному связыванию с мицеллами казеина. В результате ионного взаимодействия хитозана с белками обезжиренного молока достигается 90 - 92% выход целевого продукта. Использование исследуемых хитозанов с различными молекулярными массами позволяет получить коагулят, в котором 1г хитозана связывает 6,0 - 6,2 г белков молока.

Белки молока при рН выше их изоэлектрических точек имеют отрицательный заряд, благодаря чему способны к ионному взаимодействию с положительно заряженными молекулами хитозана, результатом которого является образование коагулята. При исследовании взаимодействия отрицательно заряженных белков молока при рН 6,3 с отрицательно заряженным сукцинированным хитозаном коагулят не образуется. При этом происходит взаимодействие с белками молока, которое наблюдается в нативном электрофорезе (рисунок 4).



1. Молоко с 0,1% раствором сукцината хитозана;
2. Молоко с 0,2% раствором сукцината хитозана;
3. Молоко с 0,5% раствором сукцината хитозана;
4. Молоко с 1% раствором сукцината хитозана;

Рисунок 4 – Электрофореграмма нативных белков молока в присутствии сукцинированного хитозана

Процесс коацервации белков молока на молекулярном уровне может быть описан образованием электростатических комплексов между отрицательно заряженными молекулами κ-казеинов мицелл и положительно заряженными группами хитозана (рисунок 5).

Мицеллы казеина можно считать макроионами, которые связываются с лигандом, в качестве которого выступает поликатионит - хитозан.

Происходит многоточечное ионное взаимодействие молекул хитозана с мицеллами казеина и белками сыворотки молока. Заряд полиионитного комплекса снижается по мере присоединения к хитозану отрицательно заряженных макроионов белков. В результате образуется электронейтральный комплекс хитозана с казеинами и белками сыворотки. Агрегация электронейтральных комплексов приводит к их выделению в виде комплексного коацервата.

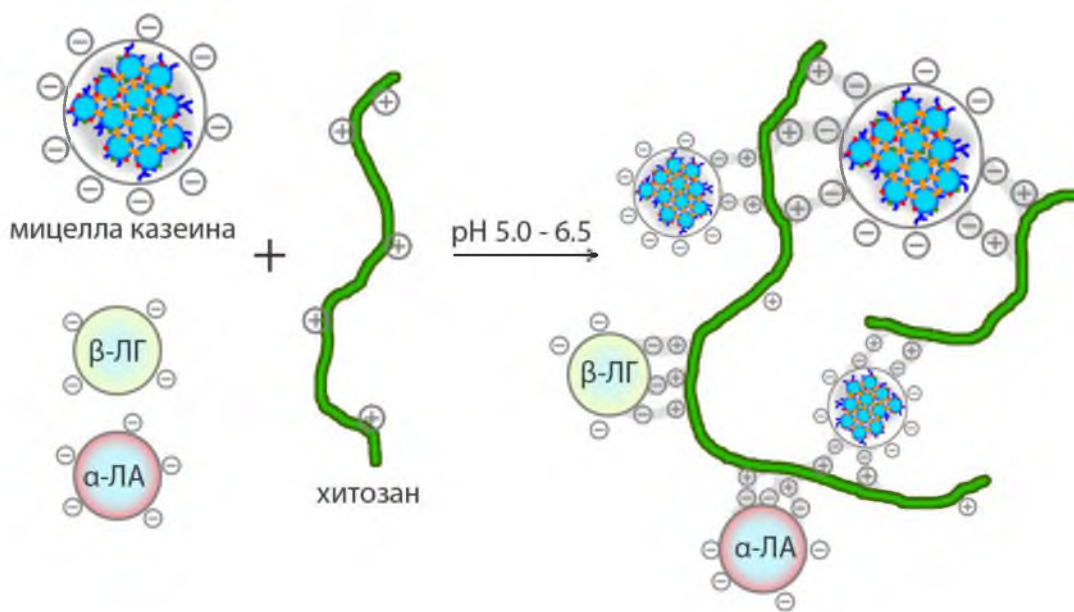


Рисунок 5 – Механизм коацервации мицелл казеина и сывороточных белков хитозаном

Состав фазы комплексного коацервата определяется стехиометрией нерастворимого электронейтрального комплекса. Агрегация частиц комплекса обусловлена их гидрофобным взаимодействием и образованием водородных связей. Необходимо отметить, что в состав полученной белковой массы кроме всех форм казеинов входят и сывороточные белки: β -лактоглобулин и α -ла [18, 20 - 22, 24, 25, 27]. Предлагаемую технологию получения казеинов с использованием хитозана отличает возможность повышения выхода целевого продукта, который достигает 90 – 92% белка обезжиренного молока, при этом сохраняется pH 6,3 полученной сыворотки, которая может быть использована в дальнейшем для получения концентрата сывороточных белков.

Полученные данные создают теоретические предпосылки к использованию хитозана в практической реализации оригинальной технологии получения казеина из обезжиренного молока.

Список литературы:

1. Walstra, P. On the stability of casein micelles / P. Walstra // J. Dairy Sci. – 1990. – № 73. – P. 1965–1979.

2. Horne, D.S. Casein micelle structure: models and muddles / D. S. Horne // *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 148–153.
3. Дымар, О.В. Производство казеина: основы теории и практики / О.В. Дымар, С.И. Чаевский // Минск. – 2007. – 70 с.
4. Остроумова, Т.А. Химия и физика молока / Т.А. Остроумова // Кемерово. – 2004. – 196 с.
5. Ельчанинов, В.В. Современные представления о структуре казеиновой мицеллы // В.В. Ельчанинов / *Молочная промышленность.* – 2011. – №4. – С. 76–78.
6. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy // Dalgleish D.G., Spagnuolo P.A., Douglas Goff H. / *International Dairy Journal*, 14 (2004), 12, 1025-1031.
7. Association of β -Lactoglobulin and β -Lactalbumin with the Casein Micelles in Skim Milk Heated in an Ultra-high Temperature Plant // Oldfield D.J., Singh H., Taylor M.W. / *International Dairy Journal*, 8 (1998), 9 (сентябрь), 765-770
8. Casein micelles and their internal structure // De Kruif C.G., Huppertz T., Petukhov A.V., Urban V.S. / *Advances in Colloid and Interface Science*, 171-172 (2012), 36-52
9. Changes in the physico-chemical properties of casein micelles in the presence of sodium chloride in untreated and concentrated milk protein / Zhao Z., Corredig M. // *Dairy Science & Technology*, 95 (2015), 1, 87-99.
10. K-Casein terminates casein micelle build-up by its 'soft' secondary structure / Nagy K., Varo G., Szalontai B. // *European Biophysics Journal*, 41 (2012), 11, 959-968
11. Huang, G.Q.; Sun, Y.T.; Xiao, J.X.; Yang, J. Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan // *Food Chem.* 2012, 135, 534–539.
12. Dutta, P.K.; Dutta, J.; Tripathi, V.S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* 2004, 63, 20–31.
13. Kean, T.; Thanou, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010, 62, 3–11.
14. Montilla, E.; Casal, E.; Moreno, F.J.; Belloque, J.; Olano, A.; Corzo, N. Isolation of bovine β -lactoglobulin from complexes with chitosan. *Food Hydrocoll.* 2007, 17, 459–464.
15. Corredig, M.; Sharafbafi, N.; Kristo, E. Polysaccharide-protein interactions in dairy matrices, control and design of structures. *Food Hydrocoll.* 2013, 25, 1833–1841.
16. Turgeon, S.L.; Schmitt, C.; Sanchez, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* 2007, 12, 166–178.
17. Hoven, V.P.; Tangpasuthadol, V.; Angkitpaiboon, Y.; Vallapa, N.; Kiatkamjornwong, S. Surface-charged chitosan: Preparation and protein adsorption. *Carbohydr. Polym.* 2007, 68, 44–53.

18. Evdokimov I. A., Alieva L. R., Varlamov V. P., Kharitonov V. D. , Butkevich T. V., Kurchenko V. P. Usage of chitosan in dairy products production // Foods and raw materials. – 2015. – V. 3. № 2. – P. 29–39.
19. Головач, Т.Н. Аллергенность белков молока и пути ее снижения / Т.Н. Головач, В.П. Курченко // Труд. Белорусск. гос. ун-та. Сер.: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем, 2010. – Т. 5, Ч. 1, С. 9–55.
20. Бакулин, А.В. Использование хитозана для выделения β -лактоглобулина из смеси белков молочной сыворотки/ А.В. Бакулин, Н.В. Гавриленко, Е.М. Червяковский, В.П. Курченко, В.П. Варламов // Биотехнология. – 2011, – №1. – С. 34–41.
21. Остерман, Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). / Л.А. Остерман. – Москва: Наука, 1981. – 288 с.
22. Хитозан. под ред: К.Г. Скрыбина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова – М.: Центр "Биоинженерия" РАН, 2013. – 593 с.
23. Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B., Acosta N., Galed G., Heras, A. Functional characterization of chitin and chitosan. Current Chemical Biology, 2009. 3, 203-230.
24. В.П. Курченко, Л.Р. Алиева, Т.В. Буткевич, Н.В. Гавриленко Механизм взаимодействия хитозана с белками молочной сыворотки // Труды БГУ. – 2013. – Т.8, ч.1. – С. 45 – 51.
25. Буткевич, Т.В. Использование хитозана в производстве молочных продуктов / Т.В. Буткевич, В.П. Варламов, И.А. Евдокимов, Л.Р. Алиева, В.П. Курченко // Труды БГУ. – 2014, Т.9. Ч.2.
26. Варламов В.П., Щербинина Т.С., Бакулин А.В., Буткевич Т.В., Курченко В.П., Харитонов В.Д., Агаркова Е.Ю., Ботина С.Г. Выделение β -лактоглобулина из сыворотки: использование различных форм хитозана // Молочная промышленность. – 2013. – № 10. – С. 11–12.
27. Урьяш В.Ф., Ларина В.Н, Кокурина Н.Ю., Бакулин А.В., Каштанов Е.А., Варламов В.П. Зависимость степени упорядоченности и термодимических характеристик хитина и хитозана от их биологического происхождения // Журнал физической химии. – 2012. – Т.86. – №1.

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ МИКРОПАРТИКУЛЯЦИИ В ПЕРЕРАБОТКЕ ТВОРОЖНОЙ СЫВОРОТКИ

Баранов С.А.¹, Евдокимов И.А.²

¹ ООО «Кизельманн Рус», г. Москва, baranov@kiselmann.org

² Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

Проведен анализ технологий сывороточных белков из сладкой молочной сыворотки. Показаны возможности метода микропартикуляции для обработки концентратов сывороточных белков творожной сыворотки.