

МЕМБРАННОЕ ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ОБЕЗЖИРЕННОГО МОЛОКА: ВЛИЯНИЕ КАЗЕИНА НА ФОРМИРОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ БЕЛКОВЫХ КОНЦЕНТРАТОВ

РЕКЛАМНАЯ СТАТЬЯ

Дмитрий Николаевич Володин¹, канд. техн. наук, директор
Виктор Константинович Топалов¹, руководитель службы продаж
Ирина Кирилловна Куликова¹, канд. техн. наук, технолог-аналитик
Иван Алексеевич Евдокимов², чл.-корр. РАН, д-р техн. наук, профессор, заведующий базовой кафедрой технологии молока и молочных продуктов
Кирилл Юрьевич Сорокин², аспирант
¹ООО «ДМП», г. Ставрополь
²Северо-Кавказский федеральный университет, г. Ставрополь

Молочные белки играют ключевую роль в питании человека, являясь богатым источником незаменимых аминокислот и биологически активных соединений. Помимо пищевой ценности, они обладают уникальными технологическими свойствами, выступая в роли эмульгаторов, загустителей, стабилизаторов и т. д., что делает их незаменимыми компонентами в рецептурах многих пищевых продуктов.

По компонентному составу белковые ингредиенты, вырабатываемые методом мембранного фракционирования обезжиренного молока, можно условно разделить на несколько групп (рис. 1). Концентраты/изоляты молочного белка и мицеллярного казеина, в состав которых входят казеин и сывороточные белки в том или ином соотношении. Концентраты/изоляты нативного сывороточного белка (нКСБ), содержащие только сывороточные белки, а также продукты, содержащие индивидуальные белки (лактоферрин, лактопероксидаза) и даже отдельные фракции белков молока (рис. 1). В самостоятельную группу ингредиентов можно выделить

продукты, получаемые на основе ферментативной обработки молочного сырья: гидролизаты молочных белков и биологически активные пептиды.

Производство концентратов молочного белка (КМБ) и мицеллярного казеина (КМК) основано на использовании процессов микро- и ультрафильтрации молока. Ультрафильтрация, задерживая частицы с молекулярной массой 5–50 кДа, выделяет все высокомолекулярные компоненты сырья, включая молочный жир, казеин и сывороточные белки. КМБ содержат от 40,0 до 85,0 % белка в сухом веществе, изоляты молочного белка (ИМБ) содержат 90 % и более белка в сухом веществе, при этом исходное соотношение казеина и сывороточных белков остается неизменным. Получение КМБ с содержанием белка более 70 % и ИМБ требует комбинированного использования ультра- и диафильтрации [1].

Микрофильтрация, используемая для получения концентрата мицеллярного казеина (КМК), отделяет частицы размером более 0,1 мкм: казеиновые мицеллы

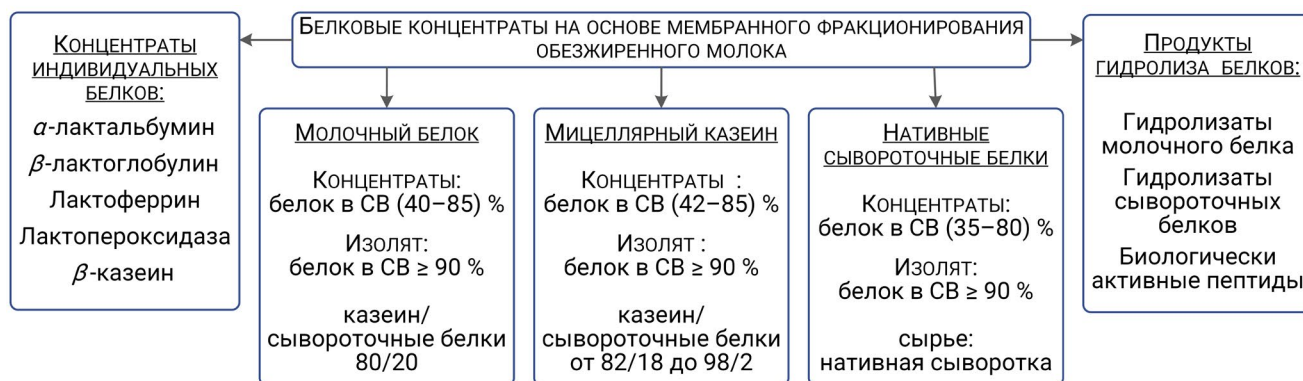


Рисунок 1. Белковые ингредиенты на основе фракционирования обезжиренного молока

и молочный жир. По сути, КМК представляет собой неденатурированный казеин в нативной мицеллярной форме с пониженным содержанием сывороточных белков (рис. 1). Дополнительное концентрирование ультра- и диафильтрацией увеличивает содержание белка за счет удаления лактозы и солей, не изменяя при этом соотношение белковых фракций в целом.

Функционально-технологические свойства КМБ и КМК, с учетом их состава, определяются, в первую очередь, стабильностью и коллоидными свойствами мицелл казеина [2]. Поэтому глубокое понимание структуры мицелл и факторов, влияющих на их устойчивость, дестабилизацию и функциональность, может способствовать более эффективному контролю качества молочных ингредиентов и разработке новых продуктов с заданными функциональными свойствами.

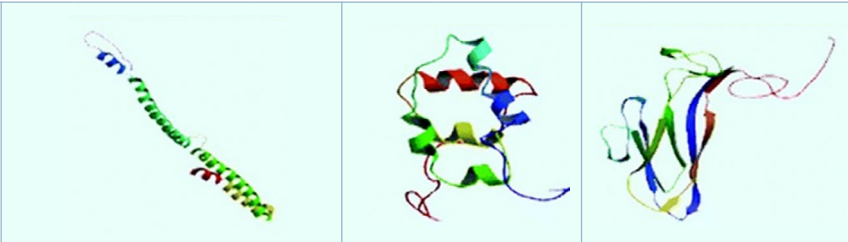
Современная биохимия молока определяет казеин как фосфорилированную и гликозилированную фракцию белков молока, которая включает 4 основных типа казеинов: αS_1 , αS_2 , β и κ (см. табл. [2]).

Исследования последних лет позиционируют казеины как реоморфные или нативно развернутые, белки, т. е. белки, способные адаптировать свою структуру к изменениям условий окружаю-

щей среды [3]. Четыре субъединицы казеина амфифильны по своей природе, характеризуются молекулярным соотношением 4:1:4:1, имеют молекулярную массу 19–25 кДа и изоэлектрическую точку в пределах 4,1–5,3 [4]. Уникальный аминокислотный состав каждой субъединицы (см. табл.) казеина определяет ее гидрофобные/гидрофильные свойства, что отражается на свойствах казеина в целом.

Фракция αS_1 (40 % от общего количества казеина) – это белок с высокой степенью гидрофобности, полипептидная цепь которого состоит из 199 аминокислот, формирующих три отрицательно заряженные пептидные области. Участки, включающие гидрофобные аминокислоты типа аланина, лейцина, метионина, остаются нейтральными. Фракция αS_2 казеина (см. табл.) составляет 10 % от общего количества казеина. Полипептидная цепь казеина αS_2 содержит 207 аминокислот, а фосфорилирование увеличивает молекулярную массу до 25,2 кДа [5]. Считается, что αS -казеины обладают свойствами молекулярного шаперона, благодаря чему в условиях стресса, таких как повышенная температура, могут стабилизировать некоторые неродственные белки, предотвращая их агрегацию [4]. Оба белка содержат много лизина, высоко фосфорилированы и способны связывать ионы кальция.

Таблица
Характеристика фракций казеина коровьего молока [2]

Показатели	Фракции казеина			
	αS_1	αS_2	β	κ
Молекулярный вес, Да	23 610	25 230	23 980	19 023
Содержание, г/л	10,0	2,6	9,3	3,3
Количество аминокислот:	199	207	209	169
Пролин	17	10	35	20
Гистидин	0	2	0	2
Глутаминовая кислота	24	25	18	13
Аспарагиновая кислота	8	11	5	1
Серинфосфат	8	11	5	1
Неполярные радикалы, %	36	40	33	33
Степень гликозилирования	0	0	0	0–5
Заряд при pH 6,6	-21	-15	-12	-3
Структурная модель [5]				

β -казеин – это также фосфопротеин, на структуру которого также влияют ионы кальция. Это неупорядоченный белок с амфифильным характером, составляет около 35 % от общего количества казеина, состоит из 209 аминокислот. β -казеин – это самая гидрофобная фракция казеина.

Интересно, что β -казеин может встречаться в формах А2 или А1, единственное различие в структурах которых заключается в том, что 67-ой аминокислотой в форме А2 является гистидин, а в А1 – пролин [6] (рис. 2 [7]). При переваривании β -казеина А1 высвобождается соединение, известное как « β -казоморфин-7», которое является опиоидом и может вызывать симптомы непереносимости молочного белка, особенно в детском возрасте [7]. Именно это было причиной популяризации, так называемого «молока А2», получаемого от пород коров, в молоке которых содержится β -казеин в А2 форме.

Фракция κ -казеина не содержит серинфосфатных кластеров, участвующих в связывании кальция. Главная особенность κ -казеина – переменная степень гликозилирования (количество остатков глюкозы) [8, 9]. Молекула κ -казеина имеет два отдельных домена, которые между фенилаланином и метионином (126–127) разделены специфической связью, расщепляемой сычужным ферментом. N-концевой пара- κ -казеин является гидрофобной частью, которая связана с мицеллой и содержит дисульфидные связи. С-концевой макропептид казеина, который отщепляется во время сычужного свертывания молока, включает участки гликозилирования, поэтому его часто называют гликомакропептидом, хотя, строго говоря, этот термин относится только к формам, которые фактически гликозилированы.

Фракции казеина самоорганизуются в высокогидратированные (порядка 3,5 мл воды/г белка) коллоидные структуры диаметром от 50 до 300 нм [5],

А2 β -казеин

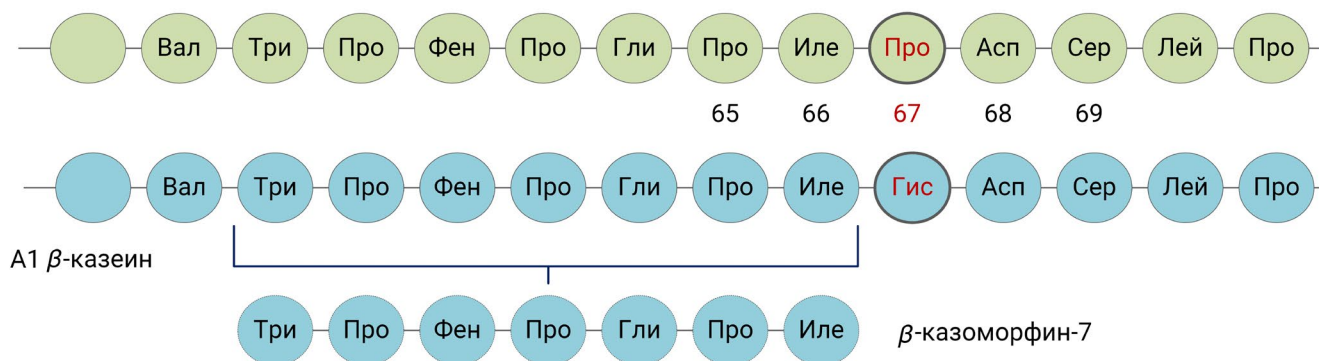


Рисунок 2. Фрагмент аминокислотной последовательности А1 и А2 β -казеина [7]

называемые казеиновыми мицеллами. Мицеллы содержат 95 % казеина (40 % β , 10 % αS_2 , 35 % αS_1 и 15 % κ -казеинов) и небелковую минеральную часть, которую принято называть мицеллярным или коллоидным фосфатом кальция.

Точная внутренняя структура казеиновой мицеллы все еще остается предметом научных исследований, на основании которых уже предложено больше десятка моделей ее строения [9]. Большинство теорий опирается на субмицеллярную модель (рис. 3 [10]), предложенную еще в 1960-е годы. Модель предполагает «сборку» мицеллы казеина из нескольких сотен субмицелл диаметром 10,0–15,0 нм. Субмицеллы включают гидрофобные участки α_s и β -фракций, формирующих плотное гидрофобное ядро частицы. На поверхности субмицелл расположены гидрофильные S-концевидные участки полипептидной цепи, с остатками фосфорной кислоты и κ -казеина.

Объединение субмицелл в мицеллу, согласно субмицеллярной модели, происходит при участии коллоидного фосфата кальция. В свою очередь гликозилированные формы κ -казеина образуют на поверхности

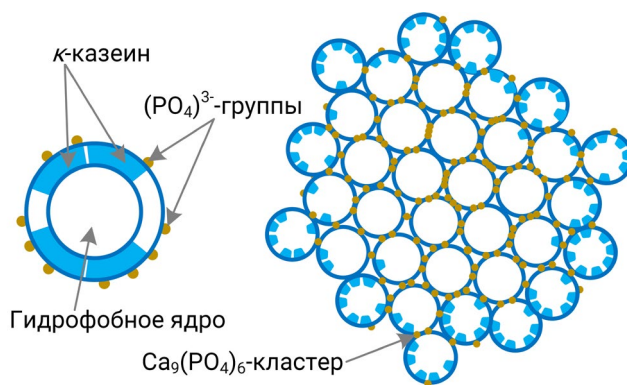


Рисунок 3. Структура казеиновой мицеллы по [10]

мицеллы высокогидратированный полиэлектролитный слой, придающий стерическую и электростатическую стабильность мицеллам казеина [12].

Можно отметить, что несмотря на некоторые существенные различия в деталях механизма мицеллообразования, более поздние модели (нанокластерная, двойного связывания, двойной сетки и др.), как и предшествующая им субмицеллярная, признают ключевую роль фосфата кальция в формировании структуры казеиновой мицеллы и определении ее технологических свойств [11]. Пониженное содержание кальция в сырье сдвигает ионное равновесие, вызывая высвобождение кальция из мицелл, что приводит к фрагментации мицелл с образованием более мелких агрегатов, повышенное – напротив приводит к укрупнению мицелл до размера, который κ -казеин уже не способен стабилизировать [12].

В целом, процесс стабилизации казеиновой мицеллы довольно сложен и определяется комплексным влиянием ряда факторов: наличие полиэлектролитного слоя, и, соответственно, поверхностного заряда, обуславливающего как действие сил отталкивания, так и формирование гидратной оболочки. Реоморфная, открытая структура казеина также является одним из факторов устойчивости мицелл.

Вполне понятно, что любые значительные изменения состава молочного сырья и физико-химического состояния его компонентов, возникающие в процессе его обработки, изменение pH и минерального состава, пастеризация, охлаждение (рис. 4 [13, 14]), могут повлечь за собой дестабилизацию казеиновой мицеллы, вплоть до агрегации и потери устойчивого состояния. Понимание

последствий этих воздействий необходимо для обеспечения стабильного качества продукции и эффективного управления технологическим процессом.

Рассматривая обобщенную схему производства сухих высокобелковых концентратов из обезжиренного молока (рис. 5), можно выделить несколько основных этапов, которые влияют на состояние мицеллы казеина: подготовка сырья, фракционирование, концентрирование и сушка концентрированной белковой фракции.

Операции подготовки сырья включают его механическую (сепарирование) и тепловую (пастеризация) обработку. Сепарирование, главным образом, обеспечивает требуемый компонентный состав готового продукта и не оказывает критического

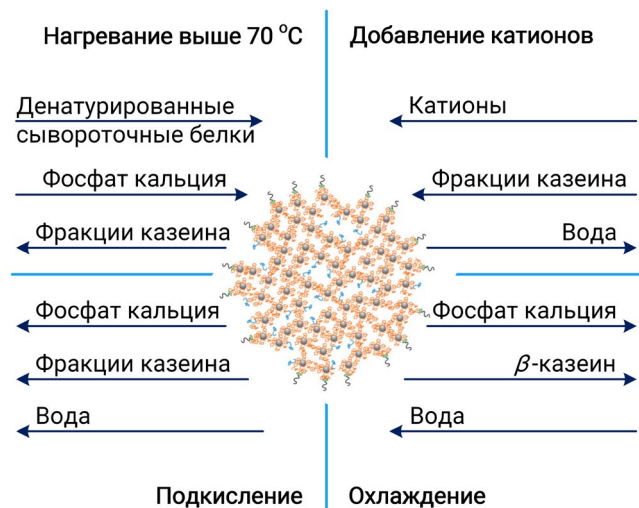


Рисунок 4. Влияние технологических факторов на стабильность казеиновой мицеллы [14]

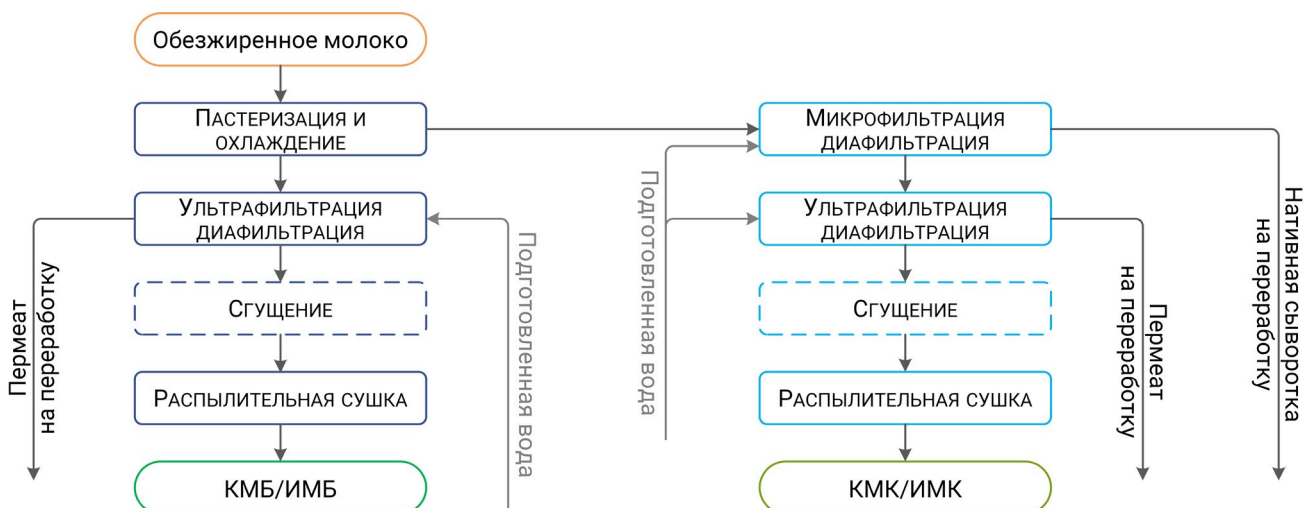


Рисунок 5. Этапы производства концентратов/изолятов молочного белка и мицеллярного казеина

действия на состояние казеиновых мицелл [2, 13]. Однако при выборе режимов тепловой обработки следует учитывать, что жесткие режимы пастеризации увеличивают количество денатурированных сывороточных белков, α -лактальбумина и β -лактоглобулина, которые денатурируют, «раскрывая» реакционноспособные группы, и образуя агрегаты друг с другом и с казеинами молока за счет образования ковалентных связей со свободными остатками цистеина в слое *k*-казеина.

Увеличение количества денатурированных белков негативно сказывается на эффективности фракционирования, ускоряя загрязнение поверхности мембран. При микрофльтрационном фракционировании образование комплекса денатурированных сывороточных белков с казеином не позволит получить концентраты мицеллярного казеина с заданным содержанием сывороточных белков.

Концентрирование молочного сырья методом мембранного фракционирования также оказывает значительное воздействие на стабильность казеиновых мицелл. При нормальных концентрациях сухих веществ молочного сырья, которым соответствует примерно 25,0 г/л казеина, мицеллы находятся в равновесии, не приближаясь друг к другу. В процессе концентрирования расстояние между частицами уменьшается. Если при 3-кратной концентрации начального объема сырья частицы мицелл казеина все еще являются свободно диффундирующими, то при дальнейшем повышении concentra-

ции их поведение меняется. Например, 6-кратное концентрирование вызывает перекрытие коллоидных частиц и искажение мицеллярной структуры, которое может также быть причиной дальнейшей агрегации мицелл за счет образования кальциевых мостиков, водородных связей и гидрофобных взаимодействий.

В отличие от обычного концентрирования, при УФ и МФ сырья происходит изменение компонентного состава системы, которое становится более значительным при использовании диафльтрации. Количество диафльтрационной воды может критически смещать равновесие между коллоидными и неколлоидными ионами в системе, тем самым также оказывая влияние на стабильность казеиновой мицеллы и функциональные свойства готового продукта [14]. Например, понижение содержания сывороточных белков в КМК способствует повышению термостабильности концентрата. В КМБ наблюдается положительная корреляция между общим содержанием кальция и концентрацией белка; однако молярное соотношение кальций/белок в КМБ90 по сравнению, например, с КМБ70 ниже, что влияет как на термостабильность, так и на кислотное свертывание восстановленных систем [15]. В свою очередь, образование комплексов между сывороточными белками и *k*-казеином в процессе тепловой обработки может быть причиной слабой активности при сычужном свертывании казеина [13].

Выбор температурного режима (50–55 °С – «теплый», 10–12 °С – «холодный») при микро- и ультрафльтрации определяется компромиссом между производительностью процесса, эффективностью разделения, минимизацией мембранного загрязнения и экономическими факторами. Повышенные температуры обеспечивают увеличение производительности и снижение капитальных затрат, однако приводят к ускорению мембранного флуинга, обусловленного, в частности, осаждением нерастворимых фосфатов кальция. Снижение температуры, хотя и уменьшает скорость фильтрации, способствует более полному удалению растворимых солей кальция и фосфора, повышая функциональные характеристики получаемого белкового концентрата. Например, использование холодной МФ улучшает растворимость КМК за счет ускорения высвобождения мицелл казеина из частиц сухого продукта во время регидратации.

Именно поэтому правильный подбор режимов мембранного фракционирования является одним из условий получения конечного продукта с требуемым составом и функциональными свойствами.



Рисунок 6. Сухой концентрат молочного белка 85

Что касается процесса сушки (рис. 4), то для предотвращения денатурации белков и максимального сохранения функциональных свойств конечного продукта, процесс распылительной сушки концентратов должен осуществляться в щадящем режиме с использованием многоступенчатой системы сушки, минимизирующей энергозатраты. Низкие температуры сушки способствуют получению продукта с оптимальными характеристиками: правильной сферической формой частиц, высокой растворимостью, хорошей сыпучестью и улучшенными органолептическими свойствами.

Таким образом, можно отметить, что производство белковых ингредиентов на основе фракционирования молочного сырья, в частности КМБ, ИМБ и КМК (рис. 6, 7), демонстрирует значительный потенциал, обусловленный растущим мировым спросом. Однако успешная реализация данной стратегии требует глубокого понимания функционально-технологических характеристик конечного продукта. Только при условии точного определения этих требований можно оптимизировать технологические режимы обработки сырья, позволяющие придать основному компоненту КМБ, ИМБ и КМК – казеину – заданные свойства. Практический опыт ООО «ДМП» подтверждает возможность получения продукции с задан-



Рисунок 7. Сухой концентрат мицеллярного казеина

ными физико-химическими и технологическими свойствами, а производство высококачественных, функциональных белковых ингредиентов обладает высокой конкурентоспособностью как на российском, так и на международном рынке, что свидетельствует о перспективности выбранного направления. ■

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Володин, Д. Н.** Высокобелковые продукты на основе фракционирования молока / Д. Н. Володин, И. К. Куликова, В. К. Топалов, И. А. Евдокимов // Молочная промышленность. 2020. № 9. С. 55–58.
2. **Yang, Y.** Casein-based hydrogels: Advances and prospects / Y. Yang [et al.] // Food Chemistry. 2021. Vol 447. 138956. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138956>
3. **Holt, C.** Caseins and the casein micelle: their biological functions, structures and behavior in foods / C. Holt [et al.] // Journal of Dairy Science. 2013. Vol. 96. P. 6127–6146. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6831>
4. **Broyard, C.** Modifications of structures and functions of caseins: a scientific and technological challenge / C. Broyard, F. Gaucheron // Dairy Science & Technology. 2016. Vol. 95(6). P. 831–862. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0220-y>
5. **Huppertz, T.** The caseins: Structure, stability, and functionality // Proteins in Food Processing / T. Huppertz [et al.]. – Cambridge, Woodhead Publishing. 2018. – P. 49–92. <http://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00004-8>
6. **Chen, X.** Bovine milk β -casein: Structure, properties, isolation, and targeted application of isolated products. Comprehensive Reviews / X. Chen [et al.] // Food Science and Food Safety. 2024. Vol. 23. Iss. 2. e13311. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13311>
7. **Gard, F.** Effects of A1 Milk, A2 Milk and the Opioid-like Peptide β -Casomorphin-7 on the Proliferation of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells / F. Gard [et al.] // Biomolecules. 2024. Vol. 14. 690. <https://doi.org/10.3390/biom14060690>
8. **Ninan, J.** Kappa Casein in Farm Animals: A Review / J. Ninan, V. P. Vadodaria // International Journal of Bio-resource and Stress Management. 2024. Vol. 15(9). P. 01–11. <https://doi.org/10.23910/1.2024.5558a>
9. **Кручинин, А. Г.** Молекулярно-генетические модификации к-казеина / А. Г. Кручинин, С. Н. Туровская, Е. Е. Илларионова, А. В. Бигаева // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. 2020. № 4(376). С. 12–16. <https://doi.org/10.26297/0579-3009.2020.4.3>; <https://elibrary.ru/oasdq1>
10. **Phadungath, C.** Casein Micelle Structure. A concise review / C. Phadungath // Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2005. Vol. 27. P. 201–212.
11. **Holt, C.** Invited review: Modeling milk stability / C. Holt, J. A. Carver // Journal of Dairy Science. 2024. Vol. 107(8). P. 5259–5279. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24779>
12. **Markoska, T.** Unravelling Conformational Aspects of Milk Protein Structure-Contributions from Nuclear Magnetic Resonance Studies / T. Markoska // Foods. 2020. Vol. 16(8). 1128. <https://doi.org/10.3390/foods9081128>
13. **Corredig, M.** Invited review: Understanding the behavior of caseins in milk concentrates / M. Corredig [et al.] // Journal of Dairy Science. 2019. Vol. 102(6). P. 4772–4782. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15943>
14. **Wang, X.** Microscopic methods for analysis of casein micelles and its aggregates in milk and milk products // Casein. Structural Properties, Uses, Health Benefits and Nutraceutical Application / X. Wang, Z. Zhao. – Academic Press, 2024. P. 199–213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-15836-0.00018-4>
15. **France, T. C.** Physicochemical properties of micellar casein retentates generated at different microfiltration temperatures / T. C. France [et al.] // Journal of dairy science. 2024. Vol. 107(5). P. 2721–2732. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-23918>