КОЛЛОИДНЫЙ ЖУРНАЛ, 2024, том 86, № 2, с. 253–265

УДК 637.5.02

К 125-летию П.А. Ребиндера

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ЗОЛЬ–ГЕЛЬ ПЕРЕХОД В МОЛОКЕ

© 2024 г. И. Т. Смыков[1, *], Д. С. Мягконосов[1]

[1]Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН, Красноармейский бульвар, 19, Углич, 152613 Россия

**e-mail: i_smykov@mail.ru*

Поступила в редакцию 30.10.2023 г.
После доработки 20.12.2023 г.
Принята к публикации 20.12.2023 г.

Целью работы является улучшение понимания механизма ферментативного гелеобразования в молоке за счет установления статистически достоверных изменений вязкости молока и соответствующих электронно-микроскопических исследований процесса структурообразования на ферментативной стадии коагуляции при использовании различных ферментных препаратов. Использование неразрушающего (Hot-Wire) метода контроля вязкости позволило подтвердить снижение вязкости в середине этой стадии и выявить ранее не описанный пик изменения вязкости в конце ферментативной стадии. Параллельно проведенные исследования с использованием трансмиссионной электронной микроскопии и различных методов подготовки препаратов позволили установить, что в конце ферментативной стадии гелеобразования в молоке запускается иерархический процесс преобразований белковой составляющей молока. Спусковым механизмом этого процесса является кооперативный конформационный переход в кластерах мицелл казеина, который вызывает цепочку все более энергоемких реакций, результатом которых является преобразование слабосвязанных кластеров мицелл в более плотные агрегаты. Окончательная структура молочного геля формируется преимущественно из образовавшихся ранее отдельных агрегатов мицелл. Отмечено, что изменений микроструктуры молочного геля на ферментативной стадии гелеобразования при использовании молокосвертывающих ферментов (МФ) животного, растительного и микробного (ГМО) происхождения обнаружено не было. Исследования молекулярно-массового распределения растворимых белковых веществ образцов, произведенных с разными типами МФ, показали, что фермент, выделенный от грибов *Rhizomucor miehei*, обладает большим протеолитическим действием на белки молока в сравнении с другими вариантами МФ.

Ключевые слова: молоко, мицеллы казеина, золь–гель переход, механизм гелеобразования, электронная микроскопия, микроструктура, производство сыра

DOI: 10.31857/S0023291224020102, **EDN:** DGBKYO

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее известной, распространенной и в то же время чрезвычайно сложной природной дисперсной системой является молоко, продукт миллионолетней эволюции жизни на Земле. Молоко как поликомпонентная, полидисперсная система состоит из более ста различных компонентов, имеющих размеры от четырех нанометров до десяти микрометров. Очевидное назначение этой сложной дисперсной системы состоит не только в обеспечении новорожденного организма питанием, минералами, витаминами и средствами иммунной защиты, но и в представлении всех этих компонентов в форме, требующей минимальных затрат энергии детского организма при их использовании, переработке и усвоении.

Одной из главных составляющих молока являются белки, основная масса которых представлена казеинами, образующими более сложные белковые частицы – мицеллы казеина. Здесь следует подчеркнуть, что используемый в биологии термин “мицелла казеина” является общепринятым, но по своей сути он не соответствует определению, принятому в коллоидной химии.

Исследованиям структуры, состава и свойств мицелл казеина посвящено множество работ [1–4], обобщая результаты которых нативные мицеллы казеина в молоке можно кратко описать следующим образом. Мицеллы казеина имеют размеры в пределах 20–300 нм и состоят из нескольких видов казеина: α_{s1}-казеин, α_{s2}-казеин, β-казеин и к-казеин при их среднем соотношении 4 : 2 : 4 : 1.

Казеины относятся к классу белков с чрезвычайно открытой и гибкой (реоморфной) конформацией, которая обеспечивает в дальнейшем их эффективное расщепление эндопротеиназами по определенным участкам с образованием биологически активных пептидов. Такое состояние казеинов в мицелле обуславливает их энергетически малозатратную переработку новорожденным организмом при обеспечении адекватного аминокислотного питания.

Молекулы казеинов, находящиеся внутри мицелл, в определенных сочетаниях объединены в нанокластеры, центрами которых являются наночастицы фосфата кальция размером около 7 нм, число наночастиц в мицеллах может меняться от 50 до 500 шт. в зависимости от размера мицелл. С этой точки зрения мицеллу казеина можно рассматривать как природный нанокомпозит [5, 6]. Наночастицы фосфата кальция в мицелле играют не только цементирующую, но и другую, не менее важную роль. В организме новорожденного, высвобождаясь из мицелл казеина, наночастицы фосфата кальция, наряду с присутствующим в молоке остеопонтином и фосфопептидами, поступают в кровь и затем в остеобластах служат исходным строительным материалом для формирования скелета новорожденного, а также выполнению некоторых других биологических функций [2, 7, 8].

Вместе с тем мицеллы казеина в молоке сильно гидратированы, степень их гидратации может меняться от 3 до 5 в зависимости от внешних условий, и если плотность собственно белка составляет около 1.45 г/см^3, то плотность мицелл казеина при этом значительно меньше – около 1.05 г/см^3, что способствует высокой устойчивости дисперсной системы. Поэтому отдельная мицелла казеина одновременно со структурой нанокомпозита представляет собой природный, но нестабильный наногель, т.е. сшитую частицу гидрогеля, которая легко разрушается под действием определенных внешних факторов [9, 10]. При этом вода занимает значительную часть объема мицеллы, образуя в ней домены размерами 20–40 нм, что в дальнейшем способствует ее быстрой активации [11, 12].

Таким образом, каждую нативную мицеллу казеина в молоке можно представить как сложный и совершенный природный бионанореактор, исходно находящийся в неактивном, пассивном состоянии и не взаимодействующий с другими мицеллами и компонентами молока, что способствует высокой устойчивости дисперсной системы [13–15].

Структурная организация мицелл обеспечивает их стабильность и устойчивость в молоке как дисперсной системе за счет гидрофильных концевых гликомакропептидов κ-казеина, молекулы которых находятся преимущественно на поверхности мицелл, а сами гликомакропептиды, имеющие длину около 7 нм, образуют на поверхности мицеллы гидрофильную щетку, определяющую общий заряд мицеллы около –18 мВ [2].

При попадании мицелл казеина в организм новорожденного мицелла, как бионанореактор, активируется желудочными ферментами. Химозин удаляет гликомакропетиды κ-казеина с поверхности мицелл, что приводит к дополнительной гидратации мицелл и высвобождению активных участков молекул казеинов. После чего вступает в действие пепсин, который вызывает протеолиз казеинов до форм, пригодных для дальнейшего усвоения детским организмом [8].

Эти свойства мицелл казеина, процессы, происходящие в организме, и их ясное понимание во многом являются основой эффективного промышленного производства молочных продуктов и, в частности, различного вида сыров. Получение молочного геля с требуемыми свойствами является ключевым моментом технологического процесса их производства. Процесс образования молочного геля, по общепринятому мнению, может быть разделен на две основные стадии: первичную (ферментативную), включающую расщепление химозином κ-казеина с первоначальным образованием мицелл пара-κ-казеина, и вторичную (неферментативную) стадию, включающую агрегацию мицелл в единую пространственную структуру геля и ее уплотнение. Механизм ферментативной стадии хорошо описан в работах [16–19]. Количественно выявлено влияние на него различных факторов окружающей среды. В работах [20, 21] отмечается, что вязкость молока в начале ферментативной стадии коагуляции несколько снижается, а к ее окончанию опять повышается.

Первоначальная агрегация гидролизованных мицелл казеина на ферментативной стадии подтверждается электронно-микроскопическими изображениями, полученными разными авторами [22, 23]. Применительно к методам электронной микроскопии используются различные способы подготовки препаратов к проведению исследований. Немаловажную роль играет объективный выбор исследователем конкретного поля зрения в полученном препарате. Однако выбор метода исследований и способа подготовки препаратов для микроскопирования неизбежно сопровождается возникновением артефактов препарирования и проблемами правильной интерпретации получаемых изображений.

Несмотря на разнообразие методов исследований микроструктуры молочного геля и использование всевозможных способов подготовки препаратов, обращает на себя внимание тот факт, что в основной массе работ отдельно проводятся исследования или только морфологии и микроструктуры отдельных мицелл казеина, или только

микроструктуры готового молочного сгустка, т.е. его начальное и конечное состояния. Фактическое описание эволюции микроструктуры молочного геля в ферментативной стадии гелеобразования, основанное на (электронно-) микроскопических изображениях, до сих пор отсутствует.

Биохимические процессы, происходящие на ферментативной стадии коагуляции молока, изучены достаточно глубоко и хорошо описаны, однако изменению реологических свойств молока и происходящих при этом изменений в структуре мицелл казеина и их взаимодействии, на наш взгляд, уделяется мало внимания. Вероятно, это связано с тем, что ферментативная стадия – скрытая, каких-либо видимых изменений для технологических нужд не происходит, и ее производственный контроль не требуется.

Цель этой работы заключается в улучшении понимания механизма ферментативного гелеобразования в молоке за счет установления статистически достоверных изменений вязкости молока и соответствующих электронно-микроскопических исследований процесса структурообразования на ферментативной стадии коагуляции при использовании различных ферментных препаратов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

В исследованиях было использовано молоко производства ООО “АгриВолга”, д. Бурмасово, Угличский р-н, Ярославская обл., Россия. Порода коров “Ярославская”, содержание жира в сыром молоке 4–4.2%, белка – 3.4–3.7%.

Для коагуляции молока использовали коммерческие молокосвертывающие ферменты марок: Marzyme® MT 2200 на основе кислой протеазы, продуцируемой грибами *Rhizomucor miehei* (EC3.4.23.23). Номинальная молокосвертывающая активность (MCA) – 2200 IMCU/г (Danisco SAS, Франция); Naturen® Extra 220 NB, представляющий собой натуральный сычужный фермент, выделенный из желудков телят, с номинальным содержанием химозина (EC3.4.23.4) не менее 95%, пепсина (EC3.4.23.1) – не более 5%. Номинальная MCA – 220 IMCU/см^3 (Chr Hansen A/S, Дания); Chy-max® M 1000 на основе рекомбинантного химозина (EC3.4.23.4) верблюда. Номинальная MCA –1000 IMCU/см^3 (Chr Hansen A/S, Дания).

Определение общей протеолитической активности молокосвертывающих ферментов проводилось методом Ансона на субстрате из гемоглобина в модификации метода, содержащегося в ГОСТ 34430–2018 “Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения протеолитической активности” применительно к слабокислым протеазам (при pH 5.3).

2.2. Подготовка молока

Определение массовой доли белка в молоке проводили по ГОСТ 34454-2018 “Продукция молочная. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля” с использованием автоматических установок: Дигестор Digest Stove HYP-320 (HANON, Китай) и Automatic Kjeldahl Distillation Unit K9840 (HANON, Китай).

Определение массовой доли жира в молоке проводили кислотным методом Гербера по ГОСТ 5867-90 “Молоко и молочные продукты. Метод определения жира”.

Определение массовой доли белка и массовой доли жира в молоке проводили перед его нормализацией.

Обработку молока проводили нагреванием до 40 ± 1°C и его нормализацией путем доведения соотношения белок/жир до 0.7. Пастеризацию молока проводили в резервуаре при температуре 68 ± 1°C в течение 10 мин. Затем охлаждали молоко до температуры 36 ± 1°C. Ферментативную коагуляцию проводили добавлением фермента из расчета 3000 IMCU/100 кг молока и перемешиванием молока в течение 2 мин. Коагуляция молока производилась при температуре 35 ± 1°C.

2.3. Определение вязкости молочного геля

Определение вязкости молока в процессе ферментативного гелеобразования проводили непосредственно в сыродельной ванне в режиме реального времени по изменению его теплопроводности методом горячей проволоки [23]. Определение вязкости молока при гелеобразовании проводили непрерывно при автоматической регистрации результатов наблюдений с интервалом 2 с.

Определение изменений вязкости и температуры молока проводили непосредственно в капиллярном вискозиметре также с использованием метода горячей проволоки [25, 26] с интервалом 1 с при автоматической регистрации результатов наблюдений с помощью ПК с предустановленной программой “OWEN Process Manager”.

2.4. Электронная микроскопия

Электронно-микроскопические исследования микроструктуры компонентов молока и молочного геля проводили с помощью трансмиссионного электронного микроскопа EM-410 (Philips, Нидерланды). Исследования проводили при минимальном токе электронного луча микроскопа и ускоряющем напряжении 40 кВ.

Подготовку препаратов для электронной микроскопии производили двумя различными методами с целью выявления возможных артефактов препарирования, сопровождающих эту процедуру,

и получения дополнительной информации о микроструктуре молочного геля.

В первом случае использовали оттенение топографии поверхности препарата вакуумным напылением тяжелого металла. Для этого образцы молока отбирали из общего резервуара через определенные моменты времени после внесения в него сычужного фермента. Образцы фиксировали при комнатной температуре 2%-м раствором глутаральдегида в 0.1 М фосфатном буфере Sorenson, pH 7.2, в течение 20 мин (0.1 мл молока к 1 мл фиксатива). После чего зафиксированные образцы разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1 : 100. С помощью пипетки каплю (5 мкл) зафиксированного образца переносили на медную сетку 400-mesh, покрытую пленкой нитроцеллюлозы (parlodium), и выдерживали в течение 2 мин.

После этого излишки раствора убирали с поверхности сетки фильтровальной бумагой и помещали сетку в вакуумную камеру для окончательной сушки при комнатной температуре. Для повышения контрастности образца на его поверхность под углом 24° в той же вакуумной камере наносили слой платины (Pt) толщиной 3–5 нм методом вакуумного резистивного распыления металла [27]. Толщину наносимого металла контролировали кварцевым датчиком. Полученный готовый образец переносили в электронный микроскоп для исследований. Образовавшиеся при нанесении металла тени отображали топографию поверхности образца.

Во втором методе препарирования использовали негативное окрашивание препарата раствором соли тяжелого металла. Здесь так же, как и в первом методе, вначале готовили препарат на медной сетке, а повышение его контрастности производили негативным окрашиванием [28, 29]. Для этого пипеткой переносили каплю (2 мкл) 4% раствора уранил ацетата на каплю зафиксированного образца, находящуюся на сетке, и выдерживали 4 мин. После выдержки излишки раствора убирали с поверхности сетки фильтровальной бумагой и помещали в вакуумную камеру для окончательной сушки при комнатной температуре. Полученный образец переносили в электронный микроскоп для исследований.

Изображения микроструктуры подготовленных препаратов, полученные с помощью электронного микроскопа, фотографировали при различных увеличениях и затем анализировали. На каждом этапе исследования анализировали не менее десяти полученных изображений и затем отбирали наиболее представительные.

2.5. Определение молекулярно-массового распределения белков

Определение молекулярно-массового распределения растворимых белковых веществ проводили методом гель-фильтрации высокого разрешения с использованием колонки Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Элюент – водный раствор 0.05 М Na_2HPO_4 + 0.15 М NaCl, скорость подачи элюента – 0.5 мл/мин; длина волны детектора – 280 нм. Калибровку колонки проводили по времени выхода белковых веществ с известной молекулярной массой: IgG (180 кДа), альдолаза (158 кДа), BSA (69 кДа), овоальбумин (43 кДа), димер β-Lg (36.0 кДа), α-La (14.4 кДа), цитохром С (12.3 кДа), триптофан (0.204 кДа). Калибровочный график был построен на основе логарифмической регрессионной модели [35].

2.6. Статистический анализ

Результаты, полученные при проведении экспериментальных исследований, анализировали с использованием программы Origin 8.1 (OriginLab, США). Также обработку полученных результатов проводили в программе EXCEL MS Office при уровне значимости 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Измерения и статистический анализ изменений вязкости

При проведении экспериментальных реологических исследований коагуляции молока в производственных условиях трудно обеспечить воспроизводимость и прецизионность получаемых результатов. Связано это как с лабильностью свойств молока, так и с неуправляемым действием внешних влияющих факторов. Существенным ограничением при измерениях вязкости молока при ферментативном гелеобразовании является то, что нельзя использовать стандартные вискозиметры, принцип действия которых основан на механических воздействиях на измеряемый объект (ротационные, колебательные, УЗ и пр.). Вызвано это тем, что любое механическое воздействие на молоко во время ферментативного гелеобразования разрушает образующуюся слабосвязанную микроструктуру. На наш взгляд, одним из подходов для оценки процессов, происходящих на ферментативной стадии коагуляции молока в сыродельной ванне, является использование неразрушающего метода контроля вязкости, основанного на контроле теплопроводности жидкости, и статистический анализ результатов многократных измерений. Такой подход позволяет избежать механического воздействия на гель, выявить систематические составляющие изменения вязкости и отделить случайные составляющие.

При проведении исследований были проанализированы результаты измерений вязкости молочного геля на 43 выработках товарного сыра.

Обработку массива результатов наблюдений проводили в несколько этапов. В связи с тем, что температура молока и его технологические свойства в разные дни несколько различались в пределах технологической нормы и количество вносимого сычужного фермента также несколько различалось, длительность ферментативной стадии коагуляции также была различна. Поэтому на первом этапе обработки массива данных было проведено их масштабирование, т.е. все группы результатов наблюдений за счет сжатия или растяжения были приведены к единой длительности – 120 с. При этом за начало процесса принимали момент внесения сычужного фермента, а его окончание определяли по моменту прекращения истечения молока через капилляр вискозиметра.

Вычисленные средние значения вязкости молока на определенных интервалах времени ферментативной стадии коагуляции использовали для графического отображения ее изменения во времени (рис. 1), где A – начало процесса, B – середина стадии, C – момент перед гель-точкой, D – момент после гель-точки.

Из графика хорошо видно, что в целом вязкость молока на ферментативной стадии коагуляции сначала снижается, а затем повышается. Это явление известно [20, 21] и объясняется оно чаще всего экспериментально подтвержденным уменьшением диаметра мицелл казеина, происходящим за счет ферментативного удаления с поверхности мицелл гликомакропептидных участков κ-казеина, а его выявление в нашем эксперименте с помощью использованного метода горячей проволоки подтверждает правильность выбора метода измерений и высокую чувствительность устройства.

Вместе с тем на полученном нами графике снижение вязкости имеет два выраженных участка, не описанных в известной нам литературе: первичный (AB) и вторичный (BC). Эти участки разделены некоторым увеличением вязкости, т.е. снижение вязкости на ферментативной стадии коагуляции не монотонный процесс и не может быть просто объяснен только удалением с поверхности мицелл казеина гликомакропептидных участков. Кроме уменьшения размера мицелл, на изменения вязкости в этой фазе гелеобразования влияет то, что удаление гидрофильных макропептидов κ-казеина с поверхности мицелл приводит к тому, что поверхность мицеллы становится гидрофобной, а это, очевидно, влияет на ее подвижность в дисперсионной среде. Высвобождение из мицелл растворимого β-казеина и наночастиц фосфата кальция также влияет на реологические свойства дисперсной системы. Повышение гидратации мицелл и увеличение кажущейся объемности мицелл казеина также сказываются [12]. В целом этот вопрос требует дополнительных и тщательных

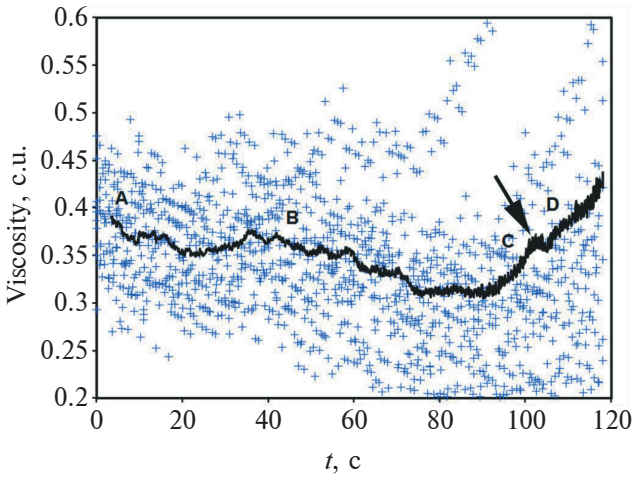

Рис. 1. Изменения вязкости молока на ферментативной стадии гелеобразования. Многократные измерения.

исследований и может быть предметом самостоятельной исследовательской работы.

Кроме того, и что не менее важно, на конечном участке полученного нами графика (рис. 1) наблюдается выраженный изгиб (указан стрелкой), предваряющий гель-точку, после которого вязкость молочного геля резко повышается. Появление такого статистически значимого изменения вязкости молока в конце ферментативной стадии коагуляции потребовало проведения дополнительных исследований. В связи с этим были проведены электронно-микроскопические исследования возможных изменений в микроструктуре мицелл казеина на этой стадии.

3.2. Электронная микроскопия

На рис. 2 и 3 показаны электронно-микроскопические фотографии мицелл казеина в исходном пастеризованном молоке в момент времени (A) при разных увеличениях. Изображения мицелл казеина на этих рисунках, полученные с использованием метода негативного контрастирования препарата раствором уранил ацетата, указывают на неидеальность их сферической формы и подтверждают существование на поверхности мицелл специфичной молекулярной щетки, которая в общем случае не является равномерной и представляет собой гидрофильную часть фракции κ-казеина мицеллы.

Наличие такой щетки гликомакропептидов на поверхности мицелл казеина отмечено еще в работе [31], однако там она представлена равномерной. Наличие неравномерности этой щетки означает, что на поверхности мицелл существуют участки с различными уровнями гидрофильности. Отмеченная неравномерность приводит к тому,

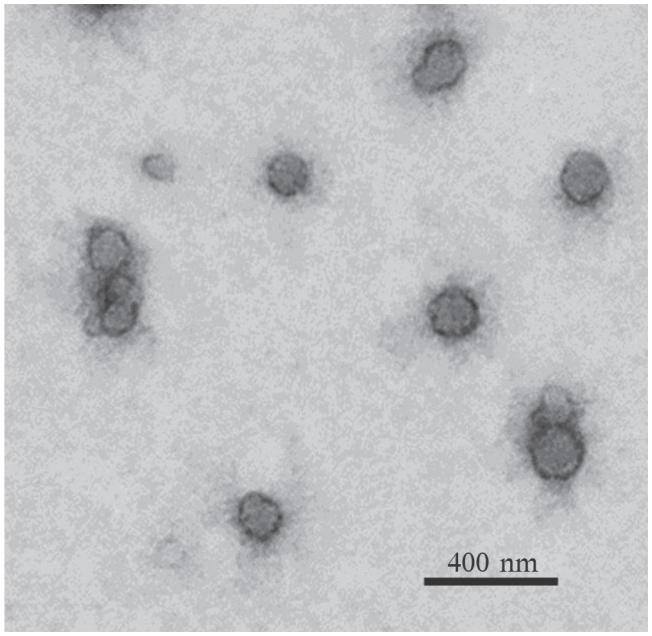

Рис. 2. Мицеллы казеина в исходном молоке (момент А).

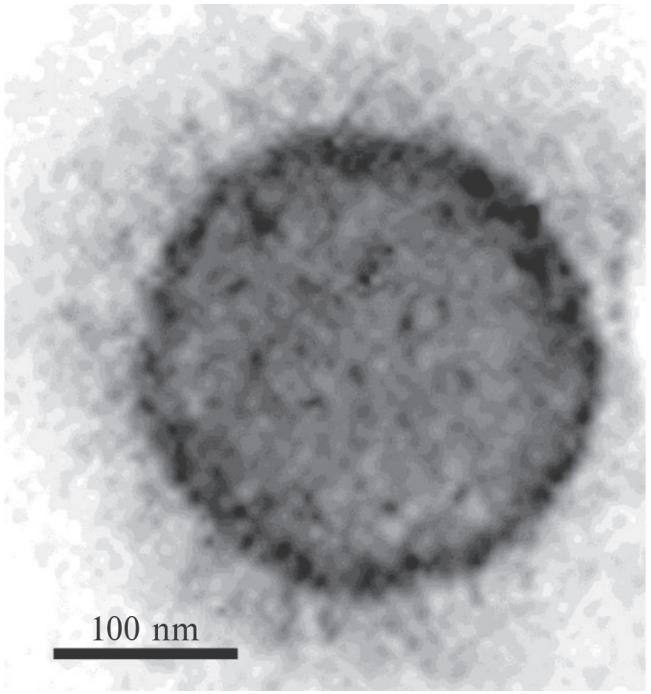

Рис. 3. Мицелла казеина при большем увеличении.

что в исходном молоке, как это видно из изображений, также могут присутствовать отдельные димеры и тримеры мицелл, образованные слабыми гидрофобными взаимодействиями.

На рис. 4 приведены электронно-микроскопические фотографии мицелл казеина в молоке, полученные при подготовке препаратов методом оттенения, в характерные моменты времени, обозначенные на рис. 1. В начале ферментативной стадии коагуляции казеиновые мицеллы обособлены (рис. 4а), а после частичного удаления гликомакропептидных участков молекул к-казеина активно образуются ди-, три- и тетрамеры (рис. 4б), в которых мицеллы пока еще связаны друг с другом слабыми гидрофобными и вандерваальсовскими взаимодействиями. Любое перемешивание молока в этот момент приводит к разрыву этих слабых связей и к уменьшению плотности геля в дальнейшем.

Затем (рис. 4в) из ди-, три- и тетрамеров и отдельных мицелл образуются слабосвязанные кластеры. Слабый характер связей между мицеллами казеина в образующихся кластерах подтверждается незначительным изменением вязкости образца на этом участке стадии гелеобразования. Рис. 5 демонстрирует образование небольших слабосвязанных кластеров мицелл к моменту времени (В) на рис. 1 (началу первичной фазы ферментативного гелеобразования), полученных различными методами препарирования, что исключает неверную их интерпретацию.

В этот момент времени молекулы молокосвертывающего фермента (Naturen® Extra 220 NB) удалили с поверхности части мицелл гликомакропептиды к-казеина, находившихся на поверхности мицелл и образовывавших поверхностный ворсистый слой с гидрофильными свойствами. Как результат, поверхность мицеллы (или ее часть) стали гидрофобными, что энергетически невыгодно для дисперсной системы, и, уменьшая свою свободную энергию, система стремится к уменьшению размеров свободных гидрофобных участков за счет объединения мицелл в кластеры, связанные гидрофобными взаимодействиями. Как на рис. 5а, так и на рис. 5б, полученных различными методами препарирования, хорошо видно образование к этому моменту времени рыхлых слабосвязанных кластеров мицелл, но никак не просматривается наличие каких-либо значимых связей между ними.

Полученные результаты электронно-микроскопических исследований процесса гелеобразования близки к результатам, полученным в работах [20, 21] другими аналитическими методами, также указывающим на существование процесса агрегации мицелл казеина на ферментативной стадии, предшествующей процессу коагуляции [32].

Резкие изменения в структуре кластеров мицелл казеина наблюдаются в конце ферментативной стадии (рис. 4г). Здесь мицеллы уже пара-к-казеина, т.е. к-казеина, лишенного гликомакропептидных

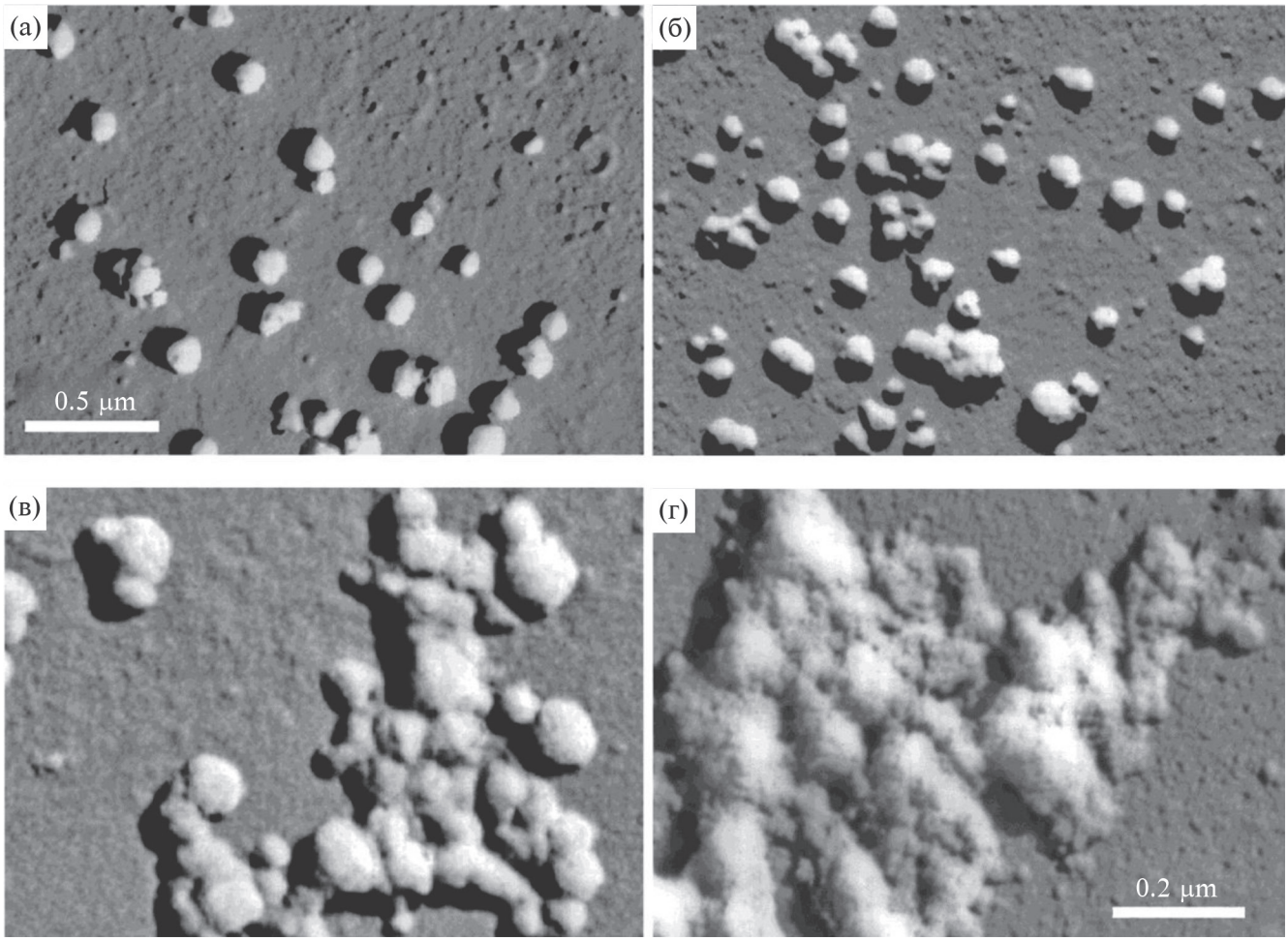

Рис. 4. Последовательное формирование микроструктуры молочного геля на ферментативной стадии гелеобразования, обозначения в соответствии с рис. 1.

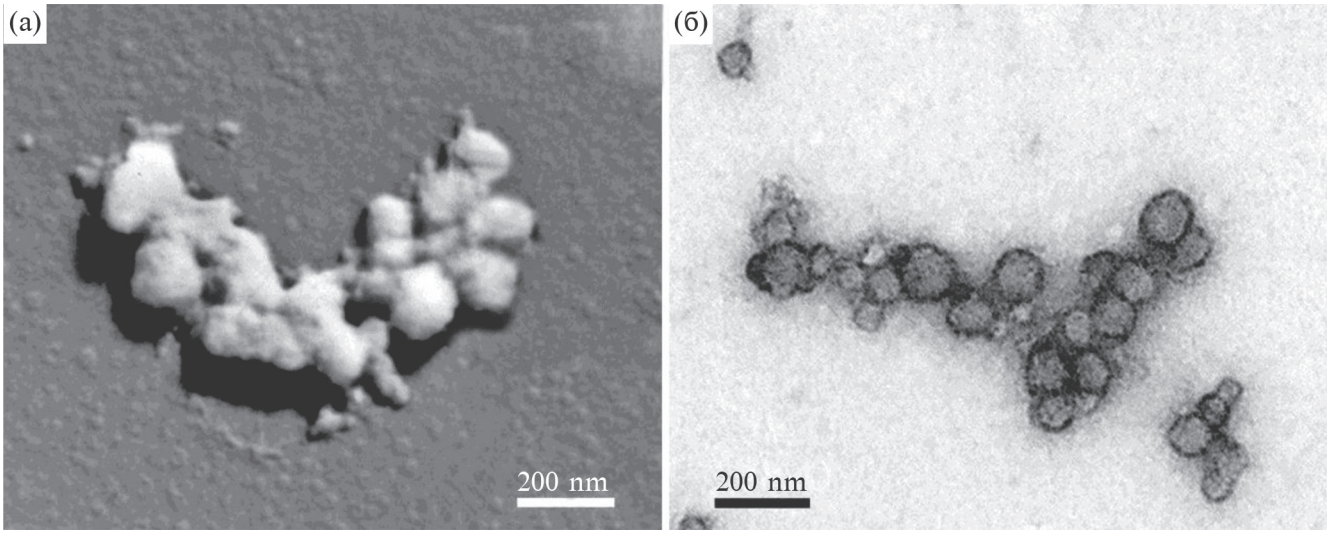

Рис. 5. Образование кластеров мицелл казеина к середине ферментативной стадии гелеобразования: (а) метод оттенения; (б) метод контрастирования.

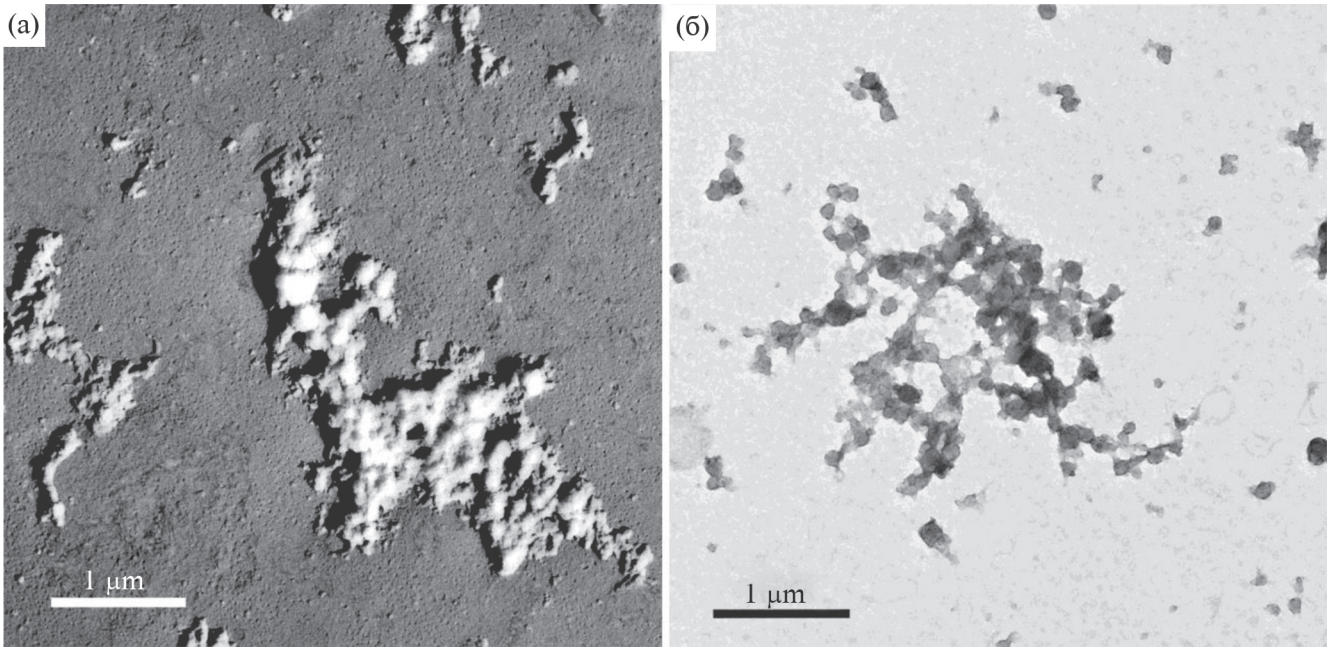

Рис. 6. Агрегаты мицелл в конце ферментативной стадии гелеобразования: (а) метод оттенения; (б) метод контрастирования.

участков, выглядят сильно деформированными, частично разрушенными.

В дальнейшем эти кластеры уплотняются за счет колебательных и вращательных движений мицелл и молекул казеина внутри кластера и образования за счет этого дополнительных ковалентных межмицеллярных связей, в результате чего происходит преобразование кластеров в связные агрегаты.

Нетрудно заметить, что изменение состояния кластеров мицелл из морфологии 4в в морфологию 4г совпадает с появлением на этом участке графика изменения вязкости геля ранее отмеченного статистически значимого пика. Непосредственно после этого участка, который логично принять за физическое отображение гель-точки, начинается интенсивный рост вязкости геля, т.е. начинается вторичная стадия коагуляции. Аналогичный пик можно увидеть и на некоторых графиках, приводимых разными авторами [33] и полученных разными методами, что позволяет констатировать неслучайность этого явления применительно к гелеобразованию в различных пищевых дисперсных системах. Однако таких работ немного, и внимания на существование этого пика исследователи не обращают, объясняется это, скорее всего, низкой чувствительностью оборудования, используемого при рутинных исследованиях и небольшой величиной пика, воспринимаемого как погрешность измерения.

На рис. 6 приведены фотографии агрегатов мицелл в момент времени D (рис. 1), полученные разными методами подготовки препаратов.

Как видно из приведенных фотографий, мицеллы в кластерах претерпели значительные структурные изменения. Если в начале мицеллы казеина сохраняли сферическую форму и связи между ними в кластере были слабыми, то после наблюдаемого пика в кластере нет ни одной сферической мицеллы, все они развернулись, т.е. произошли конформационные изменения казеиновых молекул в мицеллах по принципу перехода типа “все или ничего”. Такой вид конформационного перехода в различных белках хорошо изучен [34] и к настоящему времени уже твердо установлено, что он является кооперативным с одновременным и резким изменением свойств белковых молекул и охватывает сразу множество аминокислотных остатков.

Из приведенных фотографий видно, что в нашем случае конформационный переход носит кооперативный характер для всех мицелл казеина в кластере. Однако для различных кластеров в системе это свойство кооперативности не соблюдается и фазовый переход для системы в целом происходит в течение некоторого времени (от гель-точки до начала синерезиса) и определяется как внешними условиями, так и собственными свойствами мицелл.

По нашему мнению, в конце ферментативной стадии гелеобразования в молекулах казеина, образующих мицеллы, и в кластерах мицелл происходит кооперативный конформационный переход в молекулах казеинов. Этот кооперативный конформационный переход, во-первых, приводит

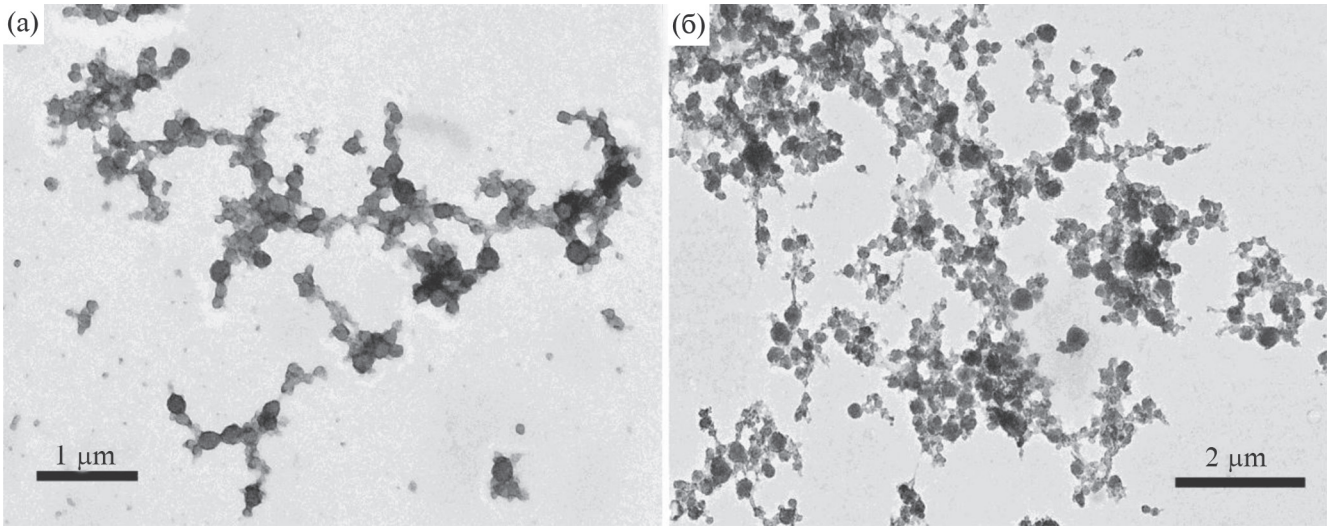

Рис. 7. Формирование целостной структуры молочного геля: (а) и (б) – метод контрастирования уранил ацетатом, различное увеличение.

к увеличению размеров мицелл за счет увеличения их гидратации и, соответственно, их объемной доли, что вызывает некоторое первоначальное увеличение вязкости и, во-вторых, вызывает резкое изменение физико-химических свойств мицелл, способствующих дальнейшему формированию целостной структуры молочного геля. Таким образом, слабосвязанные кластеры мицелл преобразуются в связные агрегаты оставшихся мицелл и белковых частиц, образовавшихся после конформационного перехода. Это мнение основано на анализе ряда изображений состояния геля к концу вторичной стадии гелеобразования. На рис. 7 представлены фотографии агрегатов частиц казеина при образовании целостной структуры. Здесь хорошо видны небольшие агрегаты мицелл, их взаимодействие и образование из них общей структуры

Среди исследователей широко распространено мнение, что структура сычужного молочного геля может быть охарактеризована как пространственная (трехмерная) сетка из цепочек мицелл казеина. Распространено мнение и приводятся многочисленные повторяющиеся художественные иллюстрации (модели) того, что на ферментативной стадии гелеобразования отдельные мицеллы образуют цепочки. На наш взгляд, это распространенное мнение неверно по двум причинам. Первая состоит в том, что любая система стремится к уменьшению свободной энергии, а образование цепочки энергетически невыгодно при равномерном удалении гликомакропептида с поверхности мицелл. Более вероятно их случайное группирование. Вторая причина заключается в том, что цепочки могут образовываться только при анизометрическом (с двух противоположных сторон) расположении гидрофобных участков на поверхности мицелл, а это маловероятно, никем не наблюдалось и ничем не подтверждено. Проведенные исследования показали, что в конце ферментативной стадии гелеобразования формируются связные агрегаты мицелл. В дальнейшем эти агрегаты несколько уплотняются за счет флуктуационных, колебательных и вращательных движений мицелл казеина и белковых частиц внутри агрегата и образования за счет этого дополнительных межмицеллярных связей, и именно эти агрегаты являются в дальнейшем исходным материалом для образования целостной пространственной структуры молочного геля во вторичной стадии процесса.

При проведении электронно-микроскопических исследований изменений микроструктуры молочного геля на ферментативной стадии гелеобразования были использованы три вида молокосвертывающих ферментов (МФ) животного, растительного и микробиального (ГМО) происхождений. Однако каких-либо значимых различий в микроструктуре геля в зависимости от вида фермента обнаружено не было.

Для оценки влияния вида молокосвертывающего фермента на молекулярно-массовое распределение белков были проведены дополнительные исследования на экспериментальных выработках мягких рассольных сыров.

3.3. Молокосвертывающая и протеолитическая активность МФ

Результаты измерения протеолитической активности и значения МСА/ПА, рассчитанные исходя из номинальной активности МФ, в соответствии с ГОСТ 34430-2018, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Молокосвертывающая и общая протеолитическая активность МФ

Марка МФ	Молокосвертывающая активность (МСА), номинальная, IMCU/г	Протеолитическая активность (ПА), ед. ПА/г	Соотношение МСА/ПА, IMCU/ед. ПА
Marzyme MT 2200	2200	70.90	31
Naturen Extra 220	193*	0.97	227
Chy-max M 1000	909**	0.68	1470

Примечание. Молокосвертывающая активность препаратов Naturen Extra и Chy-max пересчитана из номинальной активности в 1 см^3 на номинальную активность в 1 г, исходя из плотности данных препаратов (г/см^3).
* Измеренная плотность препарата Naturen Extra 220 равна 1.134 г/см^3.
** Измеренная плотность препарата Chy-max M 1000 равна 1.101 г/см^3.

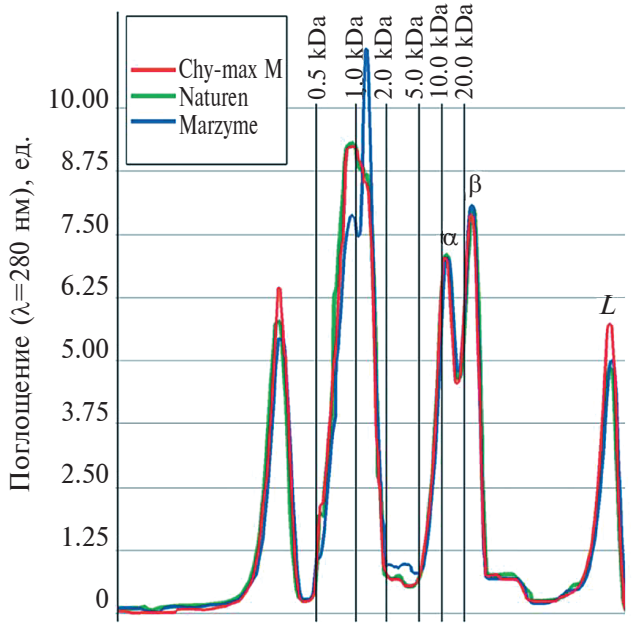

Рис. 8. Молекулярно-массовое распределение растворимых белковых веществ сыворотки от сыров, произведенных с разными типами МФ: *L* – белковая фракция, содержащая липопротеины, фосфолипиды и казеины, α – фракция альфа-лактоальбумина, β – фракция бета-лактоглобулина (идентификация фракций по данным [35]).

Из представленных в табл. 1 данных следует, что имеют место существенные отличия по величине неспецифической протеолитической активности (ПА) между МФ разного происхождения, что сказывается на величине соотношения МСА/ПА. Показатель МСА/ПА, характеризующий степень специфичности действия МФ в отношении каппа-казеина, у препарата Chy-max M 1000 в ~7 раз выше, чем у препарата Naturen Extra 220, и в ~50 раз выше, чем у препарата Marzyme MT 2200. Исходя из определенной в результате исследований величины критерия МСА/ПА, следует ожидать, что продолжительность свертывания молока препаратами будет следующей: Chy-max M < Naturen Extra < Marzyme. При этом наименьшие потери сухих веществ молока в сыворотку должны быть у вариантов сыров, производимых с препаратом Chy-max M, а наибольшие потери – у вариантов сыров, производимых с препаратом Marzyme.

3.4. Определение молекулярно-массового распределения белков

Для определения молекулярно-массового распределения растворимых белков были проведены три специальные экспериментальные выработки мягких рассольных сыров с использованием различных МФ. Активная кислотность молока перед его коагуляцией составляла 6.4 ± 0.2 ед. pH. Коагуляцию проводили добавлением каждого фермента из расчета 3000 IMCU/100 кг молока. Далее анализировали состав и свойства полученной сыворотки и выработанных свежих сыров.

Определение молекулярно-массового распределения растворимых белковых веществ в сыворотке проводили методом гель-фильтрации высокого разрешения. Из хроматограмм, приведенных на рис. 8, видно, что молекулярно-массовое распределение белковых веществ молочной сыворотки, полученной при использовании МФ Marzyme, несколько отличается от молекулярно-массового распределения в образцах сыворотки от сыров, произведенных с МФ Naturen и Chy-max M.

Уровень pH в свежих сырах через 24 ч после их выработки находился в пределах 5.05 ± 0.10 ед. pH за счет действия заквасочной микробиоты, т.е. близко к уровню pH, при котором была определена протеолитическая активность МФ в условиях *in vitro* (pH 5.3). Это позволяет соотнести оценки величины ПА МФ, измеренные *in vitro*, с фактическим протеолитическим действием МФ на свежие рассольные сыры в реальных условиях.

Полученный результат позволяет говорить о большем протеолитическом действии МФ

Marzyme на белки молока в сравнении с другими вариантами МФ. Больший уровень протеолитической активности Marzyme может быть причиной получения более слабого молочного сгустка и больших потерь сухих веществ сгустка в сыворотку при дальнейшей механической обработке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что статистический анализ многократных измерений вязкости молока на ферментативной стадии гелеобразования с использованием неразрушающего (Hot-Wire) метода позволил подтвердить снижение вязкости в середине этой стадии и выявить ранее не описанный пик изменения вязкости в конце ферментативной стадии. Отмечено, что возникновение этого пика по времени совпадает с кооперативным конформационным переходом в образовавшихся ранее кластерах мицелл параказеина. Электронно-микроскопическими исследованиями определено, что в конце ферментативной стадии гелеобразования в молоке запускается иерархический процесс преобразований белковой составляющей молока. Спусковым механизмом этого процесса является кооперативный конформационный переход в кластерах мицелл казеина, который вызывает цепочку все более энергоемких реакций в известной последовательности: гидрофобные взаимодействия → водородные связи → электростатическое притяжение → кальциевые мостики, результатом чего является преобразование слабосвязанных кластеров мицелл в более плотные агрегаты. Окончательная структура молочного геля формируется на неферментативной стадии гелеобразования преимущественно из образовавшихся ранее отдельных агрегатов.

При проведении электронно-микроскопических исследований изменений микроструктуры молочного геля на ферментативной стадии гелеобразования были использованы три вида молокосвертывающих ферментов (МФ) животного, растительного и микробного (ГМО) происхождений. Однако каких-либо значимых различий в микроструктуре геля в зависимости от вида фермента обнаружено не было.

Исследования молекулярно-массового распределения растворимых белковых веществ образцов, произведенных с разными типами МФ, показали, что фермент, выделенный от грибов *Rhizomucor miehei*, обладает большим протеолитическим действием на белки молока в сравнении с другими вариантами МФ.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FNEN-2019-0010 Федерального научного центра пищевых систем им. В.М. Горбатова Российской академии наук. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ingham B., Erlangga G.D., Smialowska A., Kirby N.M., Wang C., Matia-Merino L., Haverkamp R.G., Carr A.J.* Solving the mystery of the internal structure of casein micelles // Soft Matter. 2016. V. 12. № 14. P. 6937–6953. https://doi.org/10.1039/c5sm00153f
2. *Holt C.* A quantitative calcium phosphate nanocluster model of the casein micelle: The average size, size distribution and surface properties // European Biophysics Journal. 2021. V. 50. № 6. P. 847–866. https://doi.org/10.1007/s00249-021-01533-5
3. *Smith G.N., Brok E., Christiansen M.V., Ahrne L.* Casein micelles in milk as sticky spheres // Soft Matter. 2020. V. 16. № 43. P. 9955–9963. https://doi.org/10.1039/D0SM01327G
4. *Rojas-Candelas L., Chanona-Pérez J., Méndez J., Morales-Hernández J., Benavides H.* Characterization of structural changes of casein micelles at different pH using microscopy and spectroscopy techniques // Microscopy and Microanalysis. 2022. V. 28. № 2. P. 527–536. https://doi.org/10.1017/S1431927622000162
5. *Holt C.* Inorganic constituents of milk III. The colloidal calcium phosphate of cow's milk // Journal of Dairy Research. 1982. V. 49. № 1. P. 29–38. https://doi.org/10.1017/S002202990002210X
6. *Levingstone T.J., Herbaj S., Dunne N.J.* Calcium phosphate nanoparticles for therapeutic applications in bone regeneration // Nanomaterials. 2019. V. 9. № 11. P. 1570. https://doi.org/10.3390/nano9111570
7. *Lenton S., Wang Q., Nylander T., Teixeira S., Holt C.* Structural biology of calcium phosphate nanoclusters sequestered by phosphoproteins // Crystals. 2020. V. 10. № 9. P. 755. https://doi.org/10.3390/cryst10090755
8. *Nelson D.* Physiological calcium phosphate management in two biofluids // Preprints. 2023. 2023060464. https://doi.org/10.20944/preprints202306.0464.v1

9. *Dasarahally-Huligowda L.K., Goyal M.R., Suleria H.A.R.* Nanotechnology applications in dairy science: packaging, processing, and preservation. Apple Academic Press, Florida, USA, 2019. https://doi.org/10.1201/9780429425370
10. *Radha K., Thomas A., Sathian C.T.* Application of nanotechnology in dairy industry: prospects and challenges – A review // Indian Journal of Dairy Science. 2014. V. 67. № 5. P. 367–374.
11. *Smykov I.T.* Nanotechnology in the dairy industry: benefits and risks. The ELSI Handbook of Nanotechnology: Risk, Safety, ELSI and Commercialization, Ed.: C.M. Hussain, Wiley-Scrivener Publishing LLC, USA, 2020. pp. 223–275. https://doi.org/10.1002/9781119592990.ch11
12. *Doudiès F., Arsène A.-S., Garnier-Lambrouin F., Famelart M.-H., Bouchoux A., Pignon F., Gésan-Guiziou G.* Major role of voluminosity in the compressibility and sol–gel transition of casein micelle dispersions concentrated at 7°C and 20°C // Foods. 2019. V. 8. № 12. P. 652. https://doi.org/10.3390/foods8120652
13. *Alves N.J., Turner K.B., Daniele M.A., Oh E., Medintz I.L., Walper S.A.* Bacterial nanobioreactors – directing enzyme packaging into bacterial outer membrane vesicles // ACS Applied Materials & Interfaces. 2015. V. 7. № 44. P. 24963–24972. https://doi.org/10.1021/acsami.5b08811
14. *Postupalenko V., Einfalt T., Lomora M., Dinu I.A., Palivan C.G.* Bionanoreactors: from confined reaction spaces to artificial organelles. Organic nanoreactors. Ed.: S. Sadjadi, Academic Press, 2016. P. 341–371. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801713-5.00011-2
15. *Itel F., Dinu I.A., Tanner P., Fischer O., Palivan C.G.* Nanoreactors for biomedical applications. Handbook of nanobiomedical research. 2014. P. 457–508. https://doi.org/10.1142/9789814520652_0064
16. *Troch T., Lefébure É., Baeten V., Colinet F., Gengler N., Sindic M.* Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review // BASE – Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. 2017. V. 21. № 4. P. 276–287. https://doi.org/10.25518/1780-4507.13692
17. *Lucey J.A.* Rennet-induced coagulation of milk. In book: Fuquay J.W., Fox P.F., McSweeney P.L.H. (eds) Encyclopedia of Dairy Sciences, V. 1. 2nd edn. Academic Press, Oxford, 2011. pp. 579–584.
18. *Sinaga H., Bansal N., Bhandari B.* Gelation properties of partially renneted milk // International Journal of Food Properties. 2017. V. 20. № 8. P. 1700–1714. https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1193515
19. *Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H.* Fundamentals of cheese science, Sec. Ed., Springer, 2017. pp 185–226.
20. *Walstra P., Bloomfield V.A., Wei G.J., Jenness R.* Effect of chymosin action on the hydrodynamic diameter of casein micelles // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure, 1981. V. 669. № 2. P. 258–259. https://doi.org/10.1016/0005-2795(81)90249-x
21. *Horne D.S., Davidson C.M.* Direct observation of decrease in size of casein micelles during the initial stages of renneting of skim milk // International Dairy Journal. 1993. V. 3. № 1. P. 61–71. https://doi.org/10.1016/0958-6946(93)90076-C
22. *Fox P.F., Guinee T.P.* Cheese science and technology. In book: Milk and dairy products in human nutrition. Y.W. Park and G.F. Haenlein (eds). Wiley-Blackwell Publishers, Oxford, UK. 2013. pp. 357–386. https://doi.org/10.1002/9781118534168.ch17
23. *Smykov I.T.* Kinetics of milk gelation. Part I. Coagulation mechanism. In book: Rheology: principles, applications and environmental impacts. Nova Science Publ., New York, 2015. pp 65–82.
24. *Smykov I.T.* Milk curd cutting time determination in cheesemaking // Food systems. 2018. V. 1. № 2. P. 12–20. https://doi.org/10.21323/2618-9771-2018-1-2-12-20
25. *Hori T.* Objective measurements of the process of curd formation during rennet treatment of milks by the hot wire method // Journal of Food Science. 1985. V. 50. № 4. P. 911–917. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb12978.x
26. *Gonçalves B.J., Pereira C.G., Lago A.M.T., Gonçalves C.S., Giarola T.M.O., Abreu L.R., Resend J.V.* Thermal conductivity as influenced by the temperature and apparent viscosity of dairy products // Journal of Dairy Science. 2017. V. 100. № 5. P. 3513–3525. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12051
27. *Matsko N., Letofsky-Papst I., Albu M., Mittal V.* An analytical technique to extract surface information of negatively stained or heavy-metal shadowed organic materials within the TEM // Microscopy and Microanalysis. 2013. V. 19. № 3. P. 642–651. https://doi.org/10.1017/S1431927613000366
28. *Kavanagh G.M., Clark A.H., Ross-Murphy S.B.* Heat-induced gelation of globular proteins: 4. Gelation kinetics of low pH β-Lactoglobulin Gels // Langmuir. 2000. V. 16. № 24. P. 9584–9594. https://doi.org/10.1021/la0004698
29. *Hayat M.A.* Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications. 4th edn. 543 pp. Cambridge: Cambridge University, 2000. https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1367
30. *Visser S., Slangen C.J., Robben A.J.* Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-pergomance size-exclusion chromatography // Journal of Chromatography A. 1992. V. 599. № 1–2. P. 205–209. https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85474-8
31. *De Kruif C.G., Holt C.* Casein micelle structure, functions and interactions. In: Advanced dairy chemistry, Vol. 1, Part B, Proteins. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. (Eds.). 3rd edn., Kluwer Academic – Plenum Publishers, New York. 2003. pp. 233–276.

32. *De Kruif C.G.* Supra-aggregates of casein micelles as a prelude to coagulation // Journal of Dairy Science. 1998. V. 81. № 11. P. 3019–3028. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75866-7

33. *Totosaus A., Montejano J.G., Salazar J.A., Guerrero I.* A review of physical and chemical protein-gel induction // International Journal of Food Science and Technology. 2002. V. 37. № 6. P. 589–601. https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00623.x

34. *Salvador D., Acosta Y., Zamora A., Castillo M.* Rennet-induced casein micelle aggregation models: A review // Foods. 2022. V. 11. № 9. P. 1243. https://doi.10.3390/foods11091243

35. *Morr C.V., Ha E.Y.W.* Whey Protein concentrates and isolates: Processing and functional properties // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1993. V. 33. № 6. P. 431–476. https://doi.org/10.1080/10408399309527643