

**CONVENIENCE THE TEST FOR THE NUTRITION
OF CHILDREN PRESCHOOL AND SCHOOL AGE****S.A. GORDYNETS, T.A. KOZLOVSKAJA**

For the first time in the Republic of Belarus developed science-based requirements for semi-finished products made of dough stuffed with food for children of preschool and school age, harmonized with international and local regulations, including in the framework of the Customs Union. The development and implementation of the State Standard of the Republic of Belarus "Semi-finished products in the test for the nutrition of children of preschool and school age will allow for an objective quality and safety control of socially significant products.

УДК 637.123

Представлена сравнительная характеристика белково-пептидного состава и антиоксидантной активности нативного и ферментированного коровьего молозива. По результатам исследований получены новые данные о влиянии ферментации молозива на изменение его биологически активных свойств. С применением спектрофотометрического и флуориметрического методов установлено возрастание антиоксидантной активности ферментированного образца молозива, что обеспечивается увеличением содержания пептидного компонента в результате гидролиза белковых субстратов бактериальными протеолитическими системами.

**БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ
И РАДИКАЛ-ВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ СВОЙСТВА
ФЕРМЕНТИРОВАННОГО КОРОВЬЕГО МОЛОЗИВА****Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь**

Т.Н. Головач, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории прикладных проблем биологии биологического факультета;

В.П. Курченко, кандидат биологических наук, доцент, заведующий лабораторией прикладных проблем биологии биологического факультета

**Международный государственный экологический институт имени А.Д. Сахарова
Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь**

Е.И. Тарун, кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры биохимии и биофизики факультета экологической медицины

Известно, что молозиво обладает более высокой питательной и биологической ценностью, чем зрелое молоко [1]. В результате гидролиза белков молока и молозива протеолитическими ферментами молочнокислых бактерий (МКБ) высвобождаются аминокислоты и пептиды, формирующие органолептические свойства кисломолочных продуктов. Вместе с тем, при ферментации казеина и сывороточных белков пробиотическими МКБ образуются биологически активные пептиды, что является актуальным при разработке продуктов функциональной направленности [2]. Так белки молока и молозива являются потенциальными предшественниками широкого спектра специфических пептидов с иммуномодулирующим, антиоксидантным, антимуtagenным, гипотензивным, противомикробным и др. действием [3].

Одной из основных причин патологических процессов в организме, вызывающих преждевременное старение и развитие многих заболеваний, является избыточное накопление свободных

радикалов. При избытке свободных радикалов и недостатке антиоксидантов в организме происходит свободнорадикальное повреждение нуклеиновых кислот, белков, липидов мембран и др. макромолекул клетки [4]. Эффективная защита от окислительного стресса обеспечивается различными антиоксидантами, которые препятствуют распространению окислительных реакций.

Антиоксидантные средства – вещества природного (животного или растительного), а также синтетического происхождения, непосредственно взаимодействующие с радикалами (прямые антиоксиданты) или тормозящие окислительный стресс путем влияния на одну или несколько стадий образования активных форм кислорода (антиоксидантные ферменты) [5]. В связи с этим полноценный рацион питания предполагает использование продуктов с антиоксидантным потенциалом или дополнительное внесение компонентов.

Радикал-восстанавливающие свойства молока, главным образом, определяются антиоксидантной активностью (АОА) казеина и сывороточных белков, в меньшей степени, наличием небелковой составляющей (витаминно-минерального компонента) [6]. АОА белков обусловлена доступными растворителю аминокислотами (восстанавливающими свойствами аминокислотных радикалов). В составе идентифицированных пептидов с выраженными антирадикальными свойствами выявлены триптофан, тирозин, метионин и гистидин [7].

В настоящее время известно несколько путей повышения АОА белков молока, в частности: ферментативный гидролиз очищенными протеазами, термическая и ультразвуковая обработка в комплексе с гидролизом, ферментация протеолитическими системами микроорганизмов.

Актуальность работы обусловлена необходимостью детального изучения ферментированной белковой фракции молока и молозива с применением современных методических подходов для получения специализированных кисломолочных продуктов с заданным белково-пептидным составом и биологически активными свойствами (в частности, антирадикальным потенциалом).

Цель работы – изучение физико-химических свойств и антиоксидантной активности нативного и ферментированного коровьего молозива.

Материалы и методы исследования. В исследовании использовали *образцы коровьего молока и молозива*, характеристика которых представлена в табл. 1.

Таблица 1. Образцы коровьего цельного молока, цельного и ферментированного молозива

Наименование образца	Характеристика физико-химических и микробиологических показателей	Производитель
молозиво сухое нативное (цельное)	–	ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», г. Москва, Российская Федерация
молозиво сухое обезжиренное	–	
молозиво сухое обезжиренное ферментированное	ацидофильная палочка – 1×10^8 КОЕ молочнокислые бактерии – 7×10^8 КОЕ	
молоко питьевое ультрапастеризованное	м.д. белка – 2,8 % м.д. жира – 2,5 % м.д. углеводов – 4,7 %	ОАО «Савушкин продукт», г. Брест, Республика Беларусь
молоко сухое цельное высшего сорта	м.д. жира – 25 % м.д. влаги – 4 %	ОАО «Полоцкий молочный комбинат», г. Полоцк, Республика Беларусь

Готовили 10 % растворы сухого молозива и молока в 10 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4). Образец молока питьевого ультрапастеризованного использовали в исходном виде (таблица 1). Массовую долю (м.д.) сухого вещества в образцах определяли по ГОСТ 3626–73.

Изучение *белково-пептидного состава* образцов молока и молозива согласно молекулярно-массовому распределению осуществляли с применением ДСН-электрофоретического анализа в полиакриламидном геле.

По данным колориметрических исследований *содержание низкомолекулярной фракции* определяли количеством тирозина (Туг, мг%), высвобождаемого при гидролизе и выявляемого в цветной реакции с реагентом Фолина; содержание Туг в образцах рассчитывали по калибровочному графику.

Для оценки АОА образцов гидролизатов применены спектрофотометрический и флуориметрический методы. *ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)-метод* основан на измерении уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ), что наблюдается при его связывании с кислородными радикалами. Антиоксиданты (АО) в реакционной среде, взаимодействуя с радикалами, замедляют свободнорадикальное окисление ФЛ. Степень уменьшения флуоресценции — это мера степени деградации ФЛ под воздействием кислородных радикалов. Подход, использованный в работе, основан на определении АОА образцов по их способности связывать свободные радикалы, образованные в системе Фентона. В данной системе генерируются гидроксильные радикалы при взаимодействии комплекса Fe(II) и этилендиаминтетрауксусной кислоты с H₂O₂. Интерпретация получаемых данных осложняется одновременным присутствием нескольких активных форм кислорода (АФК) с различной реакционной способностью. Также не исключается прямое воздействие АО на компоненты системы генерирования АФК. В экспериментальной работе использовали методику, описанную в статье Е.И. Тарун (2014) [8].

При измерении *ABTS-радикал-восстанавливающей активности* предполагается применение предварительно полученного катион-радикала на основе диаммониевой соли 2,2'-азинобис[3-этилбензтиазолин-6-сульфоновой кислоты]. ABTS^{•+} — метастабильный радикал, который может существовать в растворе продолжительное время; при внесении в среду различных антирадикальных агентов наблюдается быстрое восстановление радикала. Реакцию контролировали спектрофотометрически при λ₇₃₄: ABTS^{•+}-радикал (синее окрашивание раствора) при восстановлении преобразуется в свою бесцветную нейтральную форму. В данной системе присутствует один тип радикала и исключено влияние антиоксиданта на процесс его образования, поэтому осуществляется механизм прямого взаимодействия АО с радикалом. Измерение ABTS^{•+}-восстанавливающей активности проводили на основе модифицированной методики, описанной в статье В. Hernandez-Ledesma et al. (2007) [9].

Статистическая обработка экспериментальных данных. Построение графиков и математическую обработку результатов исследований осуществляли при помощи компьютерной программы «Microsoft Office Excel 2003» (Microsoft Corporation, США). Результаты независимых экспериментов представлены как среднее арифметическое значение ± доверительный интервал. Достоверность различий между выборками данных определяли методом доверительных интервалов.

Результаты и их обсуждение. Представлены экспериментальные данные об алгоритме исследования белково-пептидного состава нативного и ферментированного коровьего молозива, оценке его радикал-восстанавливающих свойств.

Результаты анализа белково-пептидного состава образцов молока и молозива методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле представлены на рис. 1. Для образцов нативного и ферментированного молозива установлено высокое содержание фракции иммуноглобулинов (Igs), наличие бычьего сывороточного альбумина (БСА) и следовых количеств лактоферрина (ЛФ) (рис. 1; дорож-

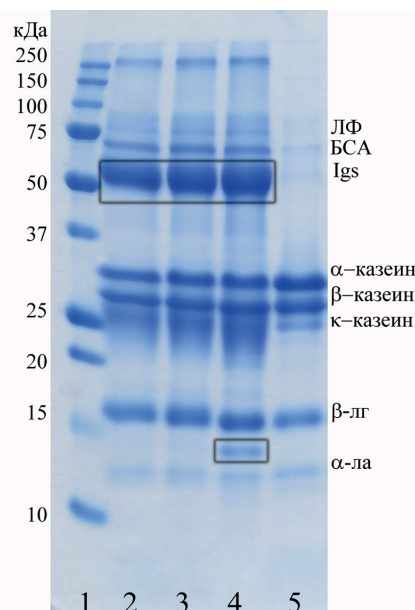


Рис. 1. ДСДS-электрофореграмма образцов цельного молока, нативного, обезжиренного и ферментированного молозива дорожка: 1 – маркер молекулярных масс, 2 – нативное молозиво, 3 – обезжиренное молозиво, 4 – ферментированное обезжиренное молозиво, 5 – цельное молоко

ки 2–4, в рамке). Согласно составу казеиновой фракции и преобладающих белков сывороточной фракции (α -лактальбумин, α -ла; β -лактоглобулин, β -лг) образцы нативного молозива и молока были сопоставимы (рис. 1; дорожки 2–5).

Наряду с этим, в образце ферментированного молозива обнаружен пептид (промежуточный продукт бактериального протеолиза) с молекулярной массой (мг) 15 кДа, что отражено на рис. 1 (дорожка 4, в рамке).

В целом, по результатам электрофоретического анализа для образцов нативного, обезжиренного и ферментированного молозива установлено высокое содержание фракции иммуноглобулинов по сравнению цельным молоком. В образце ферментированного молозива выявлен продукт бактериального протеолиза с мг 15 кДа.

Для оценки количества низкомолекулярной белковой фракции использован предложенный ниже подход. По данным колориметрических исследований в образцах молока и молозива определено количество низкомолекулярной фракции ($\text{mg} \leq 10$ кДа), не осаждаемой трихлоруксусной кислотой (ТХУ).

Согласно экспериментальным данным в образцах нативного молозива и молока выявлено сопоставимое количество низкомолекулярной фракции – ($65,5 \pm 5,5$) и ($67,1 \pm 1,5$) мг% тирозина. Наряду с этим, содержание тирозина в образце обезжиренного молозива составило ($45,8 \pm 1,3$) мг%. Снижение количества тирозина, очевидно, связано с удалением жирового компонента, с которым ассоциирована часть низкомолекулярной белковой фракции с гидрофобными свойствами. Напротив, в образце ферментированного обезжиренного молозива количество тирозина возрастает до ($235,6 \pm 8,7$) мг%, что в 3,6–5,1 раза больше показателя, установленного для нативного и обезжиренного молозива. Это связано с активностью бактериальных протеолитических систем, что приводит к накоплению низкомолекулярной пептидной фракции. Результаты эксперимента согласуются с данными ДСН-электрофоретического анализа, который позволил установить частичный протеолиз белковой фракции в образце ферментированного молозива (рис. 1, дорожка 4, в рамке).

С целью установления влияния ферментации молозива на изменение его антиоксидантного потенциала изучены радикал-восстанавливающие свойства образцов нативного, обезжиренного и ферментированного молозива. Кроме того, в сравнительных условиях оценена АОА цельного молока и молозива. В работе использовали спектрофотометрический и флуориметрический методы определения антирадикальных свойств.

Охарактеризована антиоксидантная эффективность исследуемых образцов при инактивации $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -радикала. В работе оценивали общую АОА в течение 30 мин реакции для определения суммарного содержания антиоксидантов с различной эффективностью восстановления $\text{ABTS}^{\cdot+}$ -радикала. Согласно экспериментальным данным выявлена стадия быстрого убывания количества $\text{ABTS}^{\cdot+}$ в течение 1-й мин реакции; также следует отметить замедление процесса до 4–6-й мин и постепенное угасание восстановления радикала вплоть до 30-й мин реакции.

Строили графики зависимости ингибирования поглощения катион-радикала $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (I, %) от содержания сухого вещества в анализируемых образцах (мкг/мл), как показано на рис. 2. Согласно полученному уравнению рассчитывали концентрацию пробы IC_{50} , соответствующую 50 % ингибированию поглощения. Значение IC_{50} для образца нативного молозива достигнуто при концентрации белкового компонента ($94,40 \pm 0,70$) мкг/мл, обезжиренного молозива – ($104,0 \pm 1,82$) мкг/мл, обезжиренного ферментированного молозива – ($64,29 \pm 6,0$) мкг/мл.

Снижение АОА обезжиренного молозива, очевидно, связано с удалением липидного компонента, содержащего жирорастворимые витамины А, Е и К с антиоксидантным потенциалом, и гидрофобной низкомолекулярной белковой фракции. Установлено достоверное увеличение АОА ферментированного обезжиренного молозива в 1,5–1,6 раза по сравнению с нативным и обезжиренным молозивом. Вместе с тем, сопоставимые показатели уровня АОА выявлены для образцов цельного молока и молозива – ($93,66 \pm 0,35$) и ($94,40 \pm 0,70$) мкг/мл соответственно.

На следующем этапе работы представлены результаты исследования АОА образцов молока и молозива с применением ORAC-метода. Данный метод основан на измерении во времени

уменьшения интенсивности флуоресценции флуоресцеина (ФЛ), что наблюдается при его связывании с кислородными радикалами, генерируемыми в системе Фентона.

Определена АОА нативных и ферментированных образцов по их способности связывать свободные радикалы, что приводит к замедлению свободнорадикального окисления ФЛ. Согласно полученным данным построены графики зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка в анализируемых образцах. Минимальное значение интенсивности флуоресценции наблюдалось без добавления в систему антиоксидантов и составляло 20 %.

Возрастание ингибирования свободнорадикального окисления ФЛ с 20 до 65–67, 55 и 77 % отмечено при внесении в систему 10–2000 мкг/мл образцов цельного молока и молозива, обезжиренного молозива и его ферментированного варианта соответственно. Так максимальный антирадикальный эффект отмечен в эксперименте с применением образца обезжиренного ферментированного молозива.

Строили графики зависимости интенсивности флуоресценции (А, %) от содержания сухого вещества в анализируемых образцах, как показано на рис. 3. Значение IC_{50} для образца цельного молока и молозива составило $(729,5 \pm 10,5)$ и $(480,0 \pm 20,0)$ мкг/мл соответственно, тогда как для обезжиренного молозива – $(1335,4 \pm 134,6)$ мкг/мл, что указывает на значительное снижение его антирадикальных свойств. Как и в случае определения эффективности восстановления $ABTS^{\cdot+}$ -радикала, в тест-системе с флуоресцеином также выявлено снижение ОАО обезжиренного молозива. Для образца ферментированного обезжиренного молозива значение IC_{50} составило $(139,0 \pm 11,0)$ мкг/мл, что в 3,5–9,6 раза больше показателей, установленных для цельного и обезжиренного молозива.

Согласно данным спектрофотометрического и флуориметрического методов измерения АОА представлены результаты сравнительного анализа IC_{50} образцов молока и молозива (таблица 2). При использовании альтернативных подходов для анализа антирадикальной активности, установлено возрастание антиоксидантных свойств в результате ферментации молозива.

Способность к восстановлению $ABTS^{\cdot+}$ при внесении ферментированного варианта молозива по сравнению с нативным и обезжиренным образцами увеличилась в среднем в 1,5–1,6 раза. Наряду с этим, связывание свободных радикалов, образованных в системе Фентона, возросло в 3,5–9,6 раза. В целом, применение обоих методов позволяет наиболее полно оценить АОА белков и пептидов как при действии на кислородные радикалы, образующиеся в системе Фентона, так

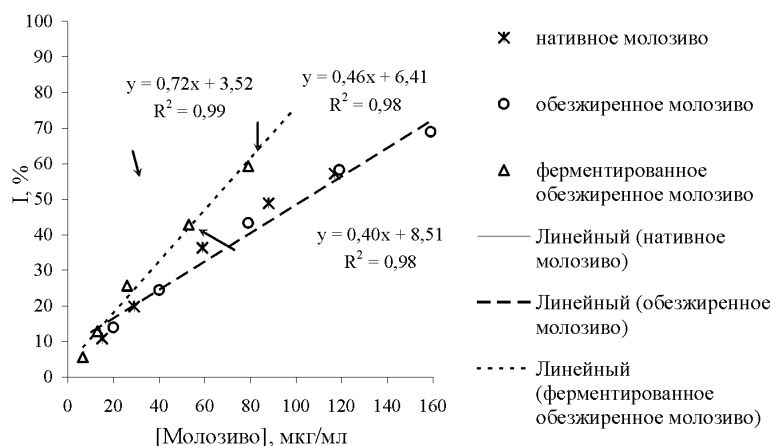


Рис. 2. Зависимость степени восстановления катион-радикала (I, %) от концентрации сухого вещества в образцах нативного, обезжиренного и ферментированного молозива

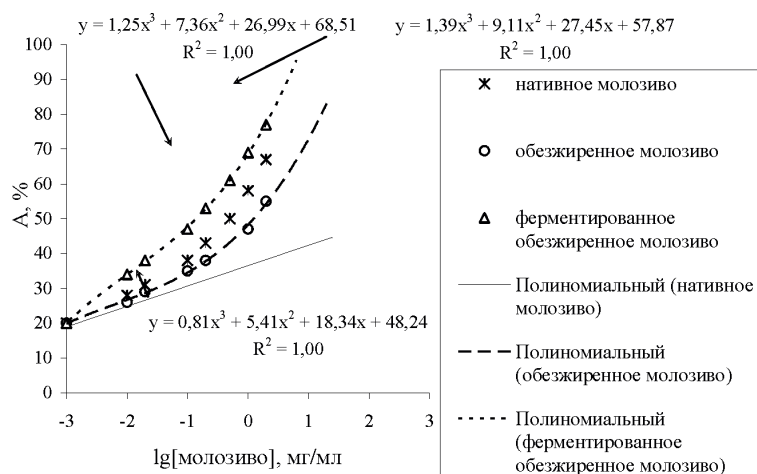


Рис. 3. Зависимость интенсивности флуоресценции (А, %) от концентрации сухого вещества в образцах нативного, обезжиренного и ферментированного молозива

и на предварительно полученный катион-радикал ABTS^{•+}. ORAC-метод чувствителен в широком диапазоне анализируемых концентраций белка, однако в ABTS^{•+}-системе присутствует один тип радикала и исключено прямое воздействие антиоксиданта на процесс образования радикалов.

Таблица 2. Характеристика антиоксидантных свойств образцов молока и молозива

Наименование образца	Содержание низкомолекулярной белковой фракции, мг% Туг	IC ₅₀ (ABTS ^{•+}), мкг (сухих веществ)/мл	IC ₅₀ (ORAC), мкг (сухих веществ)/мл
молозиво цельное	65,5±5,5	94,40±0,70	480,0±20,0
молозиво обезжиренное	45,8±1,3	104,0±1,82	1335,4±134,6
молозиво обезжиренное ферментированное	235,6±8,7	64,29±6,0	139,0±11,0
молоко цельное	67,1±1,5*	93,66±0,35*	729,5±10,5**

Примечания. * – Использовали образец молока питьевого ультрапастеризованного, ** – образец молока сухого цельного (характеристика представлена в таблице 1)

По данным колориметрических исследований и определения антиоксидантного потенциала спектрофотометрическим и флуориметрическим методами установлена корреляция количества низкомолекулярной белковой фракции и уровня антирадикальной активности (табл. 2). Так с увеличением доли гидролизованного белка наблюдается возрастание АОА ферментированного обезжиренного молозива. Снижение количества жирорастворимых витаминов и гидрофобный низкомолекулярный белковый компонент, приводит к убыли радикал-восстанавливающих свойств, что характерно для обезжиренного молозива.

В целом, увеличение антирадикальной активности ферментированного обезжиренного молозива связано с действием ферментных систем молочнокислых микроорганизмов, в частности с расщеплением белковой фракции бактериальными протеолитическими ферментами.

Проведено сравнительное исследование белково-пептидного состава и уровня антиоксидантной активности образцов молока, молозива и его ферментированного варианта. Показана корреляция количества пептидной фракции и антирадикальной активности. Для ферментированного молозива установлено возрастание антиоксидантных свойств (по данным спектрофотометрического и флуориметрического методов) и увеличение количества пептидной фракции в 3,6–5,1 раза по сравнению с нативным и обезжиренным молозивом. Повышение радикал-восстанавливающих свойств ферментированного обезжиренного молозива обусловлено расщеплением белкового компонента микробными протеазами с образованием пептидной фракции.

Выражаем благодарность В.А. Асафовой (ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности», г. Москва, РФ) за предоставление образцов молозива.

ЛИТЕРАТУРА

1. Conte, F. A study on the quality of bovine colostrum: physical, chemical and safety assessment / F. Conte, S. Scarantino // Int. Food Research J. – 2013. – Vol. 20, № 2. – P. 925–931.
2. Savijoki, K. Proteolytic systems of lactic acid bacteria / K. Savijoki, H. Ingmer, P. Armament // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2006. – Vol. 71. – P. 394–406.
3. Korhonen, H.J. Bioactive milk proteins, peptides and lipids and other functional components derived from milk and bovine colostrum / H.J. Korhonen // Functional Foods (Second Ed). – 2011. – Vol. 20. – P. 471–511.
4. Rattan, S.I. Theories of biological aging: genes, proteins, and free radicals / S.I. Rattan // Free Radic. Res. – 2006. – Vol. 40, № 12. – P. 1230–1238.
5. Opara, E.C. Antioxidants and micronutrients / E.C. Opara, S.W. Rockway // Dis. Mon. – 2006. – Vol. 52, № 4. – P. 151–163.

6. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk / A. Zulueta [et al.] // Int. Dairy J. – 2009. – Vol. 19, № 6–7. – P. 380–185.
7. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS / B. Hernández-Ledesma [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2005. – Vol. 53, № 3. – P. 588–593.
8. *Тарун, Е.И.* Сравнение антиоксидантных активностей галловой, кофейной и хлорогеновой кислот / Е.И. Тарун // Труды БГУ. – 2014. – Т. 9, ч. 7. – С. 186–191.
9. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin / B. Hernández-Ledesma [et al.] // Int. Dairy J. – 2007. – Vol. 17, № 1. – P. 42–49.

Рукопись статьи поступила в редакцию 25.06.2016

T.M. HALAVACH, V.P. KURCHENKO, K.I. TARUN

PROTEIN-PEPTIDE COMPOSITION AND RADICAL REDUCING PROPERTIES OF FERMENTED BOVINE COLOSTRUM

The comparative characteristic of protein-peptide component and antioxidant activity of native and fermented bovine colostrum was presented. According to the results of experimental work new data about the influence of colostrum fermentation to change its biologically active properties was received. Based on spectrophotometric and fluorimetric research the increase of antioxidant activity of fermented colostrum sample was found that provided by addition of peptide component as a result of protein substrates hydrolysis with proteolytic bacterial systems.

УДК 637.334.2.07:579.67(047.31).476

В статье представлены результаты изучения диффузии натамицина внутрь полутвердых сыров в процессе изготовления и хранения. Установлено, что диффузия натамицина в прикорковый слой сыра в течение первых суток после обработки более интенсивно протекала в сырах, обработка которых осуществлялась погружением в суспензию с концентрацией натамицина 0,2 %. Содержание натамицина в поверхностном слое у сыров, которые окунали в суспензию, почти в 2 раза выше по сравнению с сырами, обработка которых осуществлялась посолкой в рассоле с концентрацией натамицина 0,01 %. Способ обработки сыра натамицином, предусматривающий погружение его в суспензию, является более эффективным, так как обеспечивает достаточно постоянный уровень содержания натамицина в поверхностных слоях сыра в течение длительного времени. Содержание натамицина в поверхностном слое сыра, обработка которого осуществлялась этим способом, превышало аналогичные показатели варианта с посолкой в рассоле в 30 раз (после 60 суток созревания).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ НАТАМИЦИНА В ПРОЦЕССЕ ИЗГОТОВЛЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ ПОЛУТВЕРДЫХ СЫРОВ

**РУП «Институт мясо-молочной промышленности»,
Минск, Республика Беларусь**

*Л.Л. Богданова, кандидат технических наук,
заведующий лабораторией технологий сыроделия и маслоделия;
И.Б. Фролов, старший научный сотрудник
лаборатории технологий сыроделия и маслоделия*

Качество молочных продуктов – то есть совокупность свойств, отражающих способность продукта обеспечивать органолептические характеристики, потребность организма в пищевых