

4. Кирюткин Г. В., Молочников В. В. Мойка и дезинфекция технологического оборудования предприятий молочной промышленности. М.: Пищевая промышленность, 1976. 120 с.
5. Кузина Ж. И. Научное обоснование и промышленная реализация инновационных технологий санитарной обработки оборудования в молочной промышленности: автореф. ... дис. д-ра техн. наук: 05.18.04 / Кузина Жанна Николаевна. М., 2010. 51 с.
6. Храмцов А. Г. Общая технология молочных продуктов: учебное пособие / А. Г. Храмцов, И. А. Евдокимов, С. А. Рябцева, Т. В. Бархатова. Ставрополь: СевКавГТУ, 2005. 175 с.
7. Шалыгина А. М., Калинина Л. В. Общая технология молока и молочных продуктов: учебное пособие. М.: КолосС, 2007. 199 с.

УДК 637.1; 664.38

**Будкевич Роман Олегович, Еремина Анастасия Игоревна,
Будкевич Елена Владимировна, Слюсарев Геннадий Васильевич**

МИЦЕЛЛИЗАЦИЯ СТРУКТУР ИЗ КАЗЕИНА И ДЕКСТРАНА, ПОЛУЧЕННЫХ В РЕАКЦИИ МАЙЯРА

Получены мицеллы при сополимеризации казеина и декстрана в реакции Майяра. Использование ИК-Фурье спектроскопии позволило выявить изменения, характерные для гликозилированных белков. Растворы мицелл характеризуются изменением оптических свойств и, по данным распределения гидродинамического радиуса, мицеллизация является обратимой в зависимости от pH. При pH 4.6 (изоэлектрическая точка казеина) размер мицелл колеблется в диапазоне от 400 нм до 2000 нм, а изменение pH до 7 приводит к диссоциации мицелл. Мицеллы могут быть использованы для инкапсуляции гидрофобных веществ в пищевой промышленности.

Ключевые слова: мицеллизация, казеин, декстран, реакция Майяра, сополимер, меланоидинообразование, ИК-спектроскопия.

**Roman Budkevich, Anastasiya Eremina, Elena Budkevich,
Gennady Slyusarev**

MICELLIZATION OF CASEIN-DEXTRAN STRUCTURES OBTAINED IN THE MAILLARD REACTION

Micelles were prepared by the crosslinking copolymerization of casein and dextran in the Maillard reaction. Glycated proteins were identified using ft-IR spectrometry. Solutions of micelles are characterized by changing of optical properties. Micellization is reversible depending on pH. Micelles size ranges from 400 to 2000 nm when pH 4.6 and micelles dissociate at pH 7.0. Micelles can be used to encapsulate hydrophobic substances in the food industry.

Key words: micellization, casein, dextran, Maillard reaction, copolymer, IR - spectrometry.

В последние годы стала актуальна проблема синтеза микро- и наночастиц биологического происхождения, что связано с потенциальной опасностью синтетических наночастиц [2]. Использование казеина обусловлено его универсальными свойствами. Во-первых, его безопасностью и возможностью создавать водорастворимые белковые комплексы с жирорастворимыми витаминами, например, с каротином [12]. Во-вторых, модифицированные белки, и казеин в их числе, используют в пищевой промышленности в качестве коллоидных стабилизаторов [5].

Казеины являются преобладающими белковыми компонентами молока и состоят из нескольких фракций: $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, β -, и κ -казеин. Все четыре казеиновые фракции коровьего молока не имеют определенной структуры и представлены амфифильными белками [1]. Казеин в молоке находится

в виде мицелл, которые могут характеризоваться как нанокapsулы обеспечивающие поставку питательных веществ. Размер этих мицелл колеблется от 50 до 500 нм [3]. В сыром молоке при нормальном pH казеиновые мицеллы имеют отрицательный заряд, который способствует электростатическому отталкиванию субмицелл между собой [7]. Для изменения заряда мицелл достаточно изменить pH молока до его изоэлектрической точки, в результате чего мицеллы казеина образуют сгусток и выпадают в осадок, что является основополагающим в процессе коагуляции казеина. Приближение к изоэлектрической точке с помощью постепенного уменьшения pH может стать причиной скопления мицелл и образования геля. Эти свойства позволяют использовать казеин в пищевой промышленности как многофункциональный компонент для эмульсификации, текстуризации и стабилизации, а также в форме естественных капсул для жировых компонентов в водной среде и как переносчик гидрофобных лекарственных препаратов [11].

Гликация представляет собой ковалентное присоединение сахара к белкам. Эта конъюгация является первой ступенью в сложной реакции, широко известной как реакция Майяра [9]. Реакция Майяра, или реакция меланоидинообразования, это сложный, сопровождающийся промежуточными стадиями окислительно-восстановительный процесс взаимодействия аминсоединений с веществами, содержащими свободные карбонильные группы. С целью получения мицелл сополимера казеин-декстран может быть использована перегруппировка Амадори в реакции образования меланоидинов, которая может протекать естественным путем и является экологически чистой и безопасной. Благодаря этому казеин может стать идеальной матрицей для создания гидрофильных капсул для гидрофобных компонентов пищевых продуктов. Целью исследования было получить с использованием реакции Майяра состоящие из сополимера казеин-декстран мицеллы и оценить их физико-химические характеристики.

Материалы и методы. Приготовленный кислотным способом из обезжиренного молока казеин [4] был высушен в сушильном шкафу и применялся в дальнейших исследованиях. Для реакции сополимеризации был использован реополиглиюкин (молекулярная масса 30–70 кДа). Полученный раствор смеси казеина и декстрана замораживали при -40°C в течение 75 часов и затем подвергали лиофилизации. Реакция Майяра проводилась в соответствии с описанным ранее методом [8, 11, 12] с замороженным сухим порошком при температуре 60°C .

Исследовались спектральные характеристики водных растворов образцов при различных значениях pH. ИК-спектральный анализ проведен с использованием ИК-Фурье спектрометра Nicolet iS50XT с применением приставки НПВО. Спектрофотометрия полученных структур проводилась в диапазоне от 190 нм до 500 нм на спектрофотометре Evolution 60РС. Размер получаемых мицелл оценивался на установке PhotocorComplex (ООО «Антекс-97», Россия).

Результаты и обсуждение. Оценка ИК-спектров казеина выявила характерные полосы поглощения для белковых групп амид I и II в области 1540 см^{-1} и 1650 см^{-1} соответственно. Это согласуется с ранее полученным результатом ИК-спектров казеина. Так, характерными были пики на длинах волн $1700\text{--}1500\text{ см}^{-1}$, аналогичные спектрам казеината натрия [9]. При оценке ИК-спектров сополимера до вычитания воды основная характерная область поглощения составляла 1639 см^{-1} . После процесса сополимеризации замечено появление изменений в диапазоне $1015\text{--}1200\text{ см}^{-1}$, характерных для С-ОН групп, которые согласуются с ранее полученными данными в реакциях сополимеризации казеина [10], что свидетельствовало о гликозилировании белка (рис. 1). При вычитании воды и оценки декстрана были получены пики в диапазоне 1157 см^{-1} , 1108 см^{-1} , 1082 см^{-1} , 1018 см^{-1} , входящие в характерную для углеводов область $1180\text{--}955\text{ см}^{-1}$, представляющую собой ряд перекрывающихся пиков, связанных с растяжением некоторых групп углеводов или изгибом связей, называемых группами «сахаридов». Химические изменения, сопровождающие реакцию Майяра в казеине, приводят к некоторым изменениям в средней части ИК-спектра в результате потери части функциональных групп и появлением качественно новых. Функциональные группы белка, в том числе NH_2 , могут быть

потерины, в то время как количество связанных продуктов реакции Майяра, таких как соединения Амадори (C=O), основание Шиффа (C=N) и пиразины (C–H), могут вырасти по окончании реакции. В проведенной реакции характерными изменениями, происходящими при гликации, являются изменения в диапазоне 1015–1200 см⁻¹, что требует дополнительных исследований процесса сополимеризации белков и углеводов в реакции Майяра.

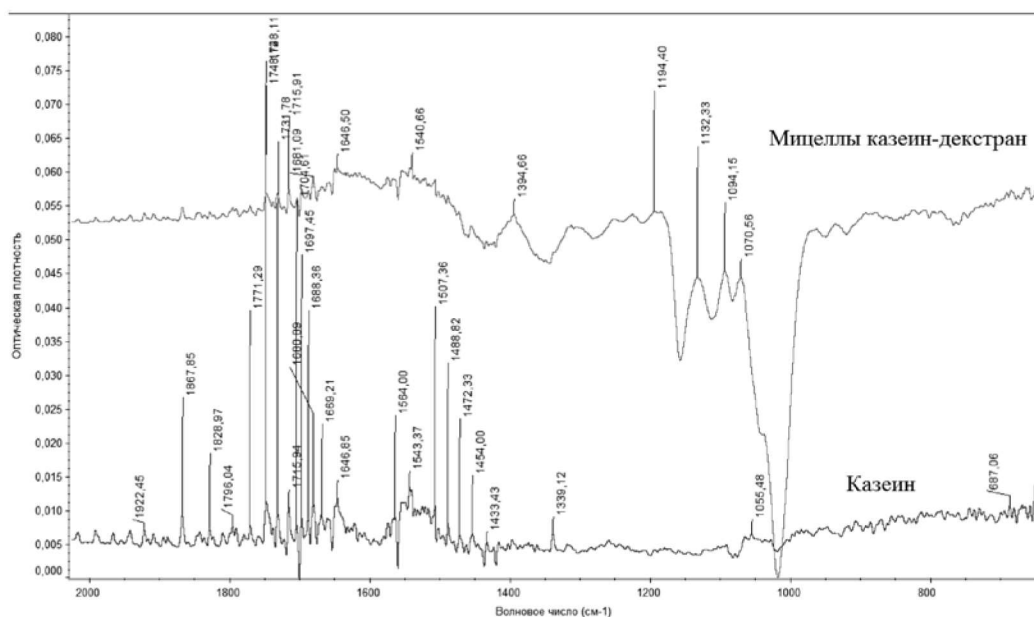


Рис. 1. ИК-спектры казеина и мицелл после вычитания воды

Растворимость полученного казеина оценивали при изменении pH около его изоэлектрической точки (pH 4,6) путем измерения спектральных характеристик в диапазоне 280–295 нм. Повышение pH от 5 до 6 незначительно увеличивало поглощение в области 286–291 нм, в то время как изменение pH от 7 до 9 характеризовалось ростом абсорбции на 291 нм и сопровождалось появлением дополнительного пика на спектрограмме на 295 нм. При pH 4,6 казеин выпадал в осадок, увеличение кислотности раствора вызвало рост поглощения на 286–291 нм.

После проведения реакции Майяра наблюдались иные спектральные характеристики растворов с поглощением в области 289–295 нм. Растворы полученных мицелл характеризовались изменением спектров поглощения, что подтверждает изменение структуры казеина и связано с присоединением декстрана в процессе гликозилирования белка. В кислой среде при pH 1 и pH 2 наблюдался максимум абсорбции на длинах волн 290 нм и 289 нм соответственно. Изменение кислотности в диапазоне pH от 3 до 5 сопровождалось отсутствием процесса выпадения осадка и высоким уровнем поглощения. При повышении pH от 6 до 9 наблюдалось снижение поглощения света. Следует отметить отличия растворимости казеина от мицелл сополимера в растворе около изоэлектрической точки. В растворе казеина при pH 4,6 наблюдалось выпадение осадка. Растворение сополимера белкового комплекса: после реакции с декстраном осадок не выпадает, но изменяются оптические свойства раствора, сопровождаясь ростом поглощения на 290 нм и 295 нм, что может указывать на образование гомогенных мицелл. Следовательно, в реакции Майяра получены мицеллы сополимера декстрана и казеина, растворимые в воде при pH около изоэлектрической точки. Это соответствует данным литературы о повышении растворимости сополимера в результате роста степени присоединения декстрана после 20 часов реакции Майяра и появлении отростков декстрана, препятствующих выпадению осадка. Изоэлектрическая точка казеина при сополимеризации с декстраном не изменяется [11].

Оценка размера мицелл представлена на рис. 2 и указывает на изменения размера частиц в зависимости от pH. В растворе с pH 7 размер мицелл был распределен в середине гистограммы около 100 нм, изменение кислотности до pH 4,6 привело к росту размера частиц с наибольшей частотой в диапазоне 600–800 нм.

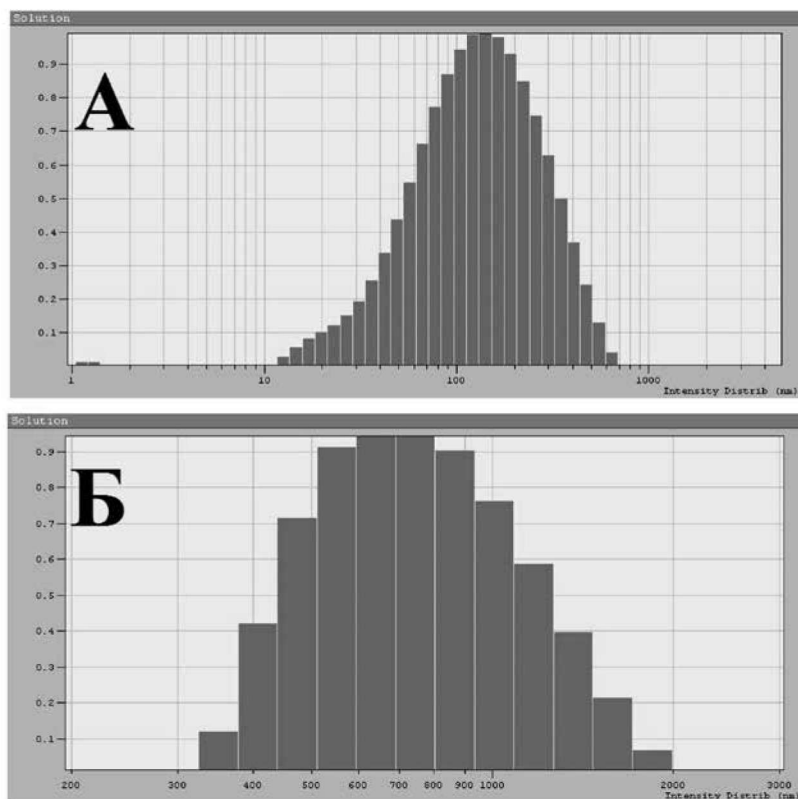


Рис. 2. Гистограмма распределения гидродинамического радиуса мицелл сополимера казеина и декстрана в зависимости от pH: (А) pH 7 и (Б) pH 4,6.

Таким образом, в реакции Майяра получены мицеллы при сополимеризации казеина и декстрана. С использованием ИК-Фурье спектроскопии показаны изменения, характерные для гликозилированных белков в соответствии с данными литературы. Растворы мицелл изменяют оптические характеристики в зависимости от pH, что обусловлено изоэлектрической точкой казеина. В соответствии с полученными данными и подтвержденными литературой, сополимеры имеют обратимое состояние в зависимости от pH: мицеллизация в изоэлектрической точке казеина с формированием казеинового ядра с оболочкой из декстрана и диссоциацию при pH, отличной от изоэлектрической точки. Мицеллы, полученные при pH 4,6, имеют размеры в диапазоне от 400 нм до 2000 нм. Полученные мицеллы могут быть использованы при изготовлении pH-зависимых казеин-декстрановых управляемых матриц для переноса гидрофобных структур и инкапсуляции гидрофобных веществ в пищевой промышленности.

Литература

1. Банникова А. В., Евдокимов И. А. Инновационный подход к созданию обогащенных молочных продуктов с повышенным содержанием белка: монография. М.: Дели-ПРИНТ, 2015. С. 8–28.
2. Будкевич Р. О., Евдокимов И. А. Безопасность использования наноразмерных частиц // Молочная промышленность. 2010. № 1. С. 46–48.

3. Евдокимов И. А. Современные проблемы науки в пищевых и перерабатывающих отраслях АПК / И. А. Евдокимов, Т. Н. Головач, В. П. Курченко, Л. Р. Алиева, Р. О. Будкевич: учебное пособие. Ставрополь, 2013. С. 6–21.
4. Курбанова М. Г., Масленникова С. М., Бондачук О. Н. Исследование закономерностей получения кислотных гидролизатов казеина // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2013. № 12. С. 101–105.
5. Ashok P., Wahyu W. Food-grade particles for emulsion stabilization // Trends in Food Science & Technology. 2016. № 50. P. 159–174.
6. Gu F. L. Structure and antioxidant activity of high molecular mass Maillard reaction products from casein-glucose / F. L. Gu, J. M. Kim, S. Abbas, X. M. Zhang, S. Q. Xia, Z. X. Chen // Food Chem. 2010. № 120. P. 505–511.
7. Helstad K. Liquid droplet-like behaviour of whole casein aggregates adsorbed on graphite studied by nanoindentation with AFM / K. Helstad, M. Rayner, T. V. Vliet, M. Paulsson, P. Dejmeek // Food Hydrocolloids. 2007. № 21. P. 726–738.
8. Minfang M. Acidic solution properties of β -casein-graft-dextran copolymer prepared through Maillard reaction / M. Minfang, P. Xiaoyun, Y. Ping, J. Ming // Journal of Colloid and Interface Science. 2006. № 301(1). P. 98–106.
9. Oliver C. M. Use of FTIR and mass spectrometry for characterization of glycated caseins / C. M. Oliver, Kher A., McNaughton D., Augustin M. A. // J Dairy Res. 2009. № 76. P. 105–110.
10. Tuinier R., Kruif C. G. Stability of casein micelles in milk // Journal of Chemical Physics. 2002. № 117(3). P. 1290–1295.
11. Xiaoyun P. Micellization of casein-graft-dextran copolymer prepared through maillard reaction / P. Xiaoyun, M. Minfang, H. Bin, Y. Ping, J. Ming // Biopolymers. 2006. № 81(1). P. 29–38.
12. Xiaoyun P., Ping Y., Ming J. Simultaneous nanoparticle formation and encapsulation driven by hydrophobic interaction of casein-graft-dextran and β -carotene // Journal of Colloid and Interface Science. 2007. № 315. P. 456–463.