



УДК 637.33.336.2

Д.В. Абрамов, Д.С. Мягконосков, Е.Г. Овчинникова, Т.Э. Муничева
ВНИИМС – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Углич

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТЕПЕНИ ЗРЕЛОСТИ СЫЧУЖНЫХ СЫРОВ

Традиционный метод оценки степени протеолиза в зрелых сырах заключается в измерении содержания различных форм растворимого азота: белкового и небелкового. Небелковый азот, в свою очередь подразделяется на азот пептидов и азот аминокислот и аммиака. Содержание азота измеряется по методу Къельдаля. Недостатком метода является продолжительность и трудоемкость измерения.

Методы титрования

Формольное титрование является простым методом для оценки содержания свободных аминогрупп в молоке и может быть использовано для оценки степени протеолиза в сырах. Метод включает титрование образца NaOH в присутствии фенолфталеина с последующим внесением формальдегида, который преобразует в свободные аминогруппы, обладающие менее щелочными свойствами, вторичные и

четверичные амины. В результате обработанный формальдегидом раствор приобретает выраженные кислотные свойства. Метод формольного титрования ранее использовался исследователями [1], [2], для оценки степени протеолиза в сыре. Однако в настоящее время он считается устаревшим, уступив место усовершенствованным методам с использованием современной техники, дающим более информативные результаты (например, гель-электрофорез, жидкостная хроматография).

Колориметрические методы

Колориметрические методы основаны на образовании окрашенных комплексов в результате реакции специальных реагентов с реакционно-способными группами азотистых веществ, образующихся при протеолизе. Степень окрашивания может служить для оценки степени протеолиза в исследуемых сырах. Среди методов, наиболее широко используемых исследователями для исследования протеолиза в сырах, можно выделить:

– основанные на реакции первичных аминов с 2,4,6-тринитробензосульфоновой кислотой, которая реагирует с первичными аминами, образуя окрашенные соединения, имеющие максимум поглощения при 420 нм [3];

– основанные на реакции свободных аминогрупп с нингидрином, приводящие к образованию яркой фиолетовой окраски, степень которой можно оценить на спектрофотометре [4];

– основанные на поглощении ароматическими аминокислотами (тирозин и триптофан) в ультрафиолетовом диапазоне. Vakaleris et al [5] разработали модификацию колориметрического метода. Метод основан на поглощении света тирозином и триптофаном. Результат измерений не зависит от влияния строения пептидных цепей, в состав которых входят данные аминокислоты.

Основываясь на приведенные выше исследования, может быть разработан экспрессный метод определения содержания белка в экстракте сыра.

Методы подготовки пробы из сыра

Казеин нерастворим в большинстве растворителей, однако, пептиды, образующиеся при его расщеплении в процессе созревания сыра, обладают растворимостью. Доля водорастворимых азотистых веществ (пептиды, аминокислоты, аммиак) увеличивается относительно общего содержания азота в сыре в процессе созревания. Это положение лежит в основе многих методов, широко используемых для оценки протеолиза в сыре. Специальные методы пробоподготовки могут эффективно использоваться для оценки специфики протеолиза, поскольку пептиды разного размера могут быть избирательно осаждены посредством специально подобранных растворителей. В современных техниках изучения степени протеолиза, основывающихся на использовании сложной измерительной техники, экстракция водорастворимых азотистых веществ является необходимым этапом первичной очистки перед анализом [6].

Вода чаще всего используется для экстрагирования растворимого азота из сыра. Массовая доля водорастворимого азота (water soluble nitrogen – WSN) является общепризнанным показателем для оценки степени зрелости. Водорастворимый экстракт сыра Чеддер содержит большое количество пептидов среднего и малого размера, а также свободные аминокислоты, органические кислоты и их соли. Экстракция с помощью воды позволяет выделить из сыра пептиды только малых раз-

меров, отделив их от крупных пептидов и белков. Использование воды в качестве экстрагирующего вещества наиболее подходит для сыров, рН которых незначительно смещается за время созревания (сыры, созревающие с участием молочнокислых бактерий). Для сыров, созревающих под действием бактерий сырной слизи или плесеней, требуется использование других экстрагентов сыра [6].

Для оценки степени протеолиза в сырах, часто используется критерий содержания азота, растворимого при рН 4,6. Активная кислотность большинства сыров, созревающих с участием только молочнокислой микрофлоры, находится на уровне 5,2–5,6 ед. рН, что не на много отличается от активности экстрагирующего буфера (рН 4,6). Фракция WSN содержит в себе фракции как белкового, так и небелкового азота, поэтому, содержание WSN в сырах выше, чем содержание небелкового азота.

В состав фракции небелкового азота попадают продукты протеолиза белков сырной массы, образующиеся под действием протеаз микроорганизмов и молоко-свертывающего фермента. Также во фракцию азота, растворимого при рН 4,6 попадают сывороточные белки и протеозо-пептоны, образующиеся под действием нативной протеазы молока – плазмина. Но их содержание ничтожно мало. По данным Kuchroo and Fox [7], исследовавших разные способы экстракции растворимых азотистых веществ из сыра, использование экстракции кислотным раствором, дает чуть более низкие результаты по содержанию растворимого азота в сравнении с экстракцией с помощью воды.

Для извлечение водорастворимого азота из сыра используются растворы CaCl_2 . Под действие ионов кальция происходит осаждение нерасщепленных белков и части пептидов. Поэтому экстракцию растворами CaCl_2 используют с целью фракционирования содержащегося в сыре WSN. С целью фракционирования производят осаждение азотистых веществ, присутствующих в экстракте с CaCl_2 при разных уровнях рН и температуре.

Kuchroo and Fox [7] установили, что с помощью 0,1 М раствора CaCl_2 можно экстрагировать только 40 % WSN содержащегося в сыре. При экстракции с помощью раствора CaCl_2 в экстракт переходят сывороточные белки, пептиды и свободные аминокислоты, а отсекаются казеины и крупные пептиды, что делает результат экстракции с помощью раствора CaCl_2 аналогичным результату экстрагирования с помощью кислого буфера (рН 4,6).

Для экстракции используют также растворы NaCl . Однако действие ионов натрия увеличивает растворимость белковых веществ. К примеру, в экстракты, полученные из сыров с помощью 5 % раствора NaCl , переходит более 90 % всего азота, содержащегося в сыре [8], в т.ч. нерастворимые в воде азотистые вещества. Это является недостатком метода экстракции с помощью растворов NaCl , который недостаточно селективен в части выделения водорастворимого азота. Введение в состав экстракционных растворов NaCl дополнительно CaCl_2 позволяет повысить степень фракционирования и вывести из состава солевого экстракта нерастворимые в воде азотистые вещества. Harwalkar and Elliott [9] разработали метод экстракции с использованием экстракционной смеси из 2-х частей хлороформа и 1-й части метанола (со смешиванием по объему). Экстрагирование растворителем производили из высушенного сублимацией сыра. Экстракт фильтровали, к фильтрату добавляли воду. Содержащий липиды слой хлороформа удаляли, а метанол удаляли из смеси

выпариванием. После выпаривания растворителя получали сухой обезжиренный препарат водорастворимых азотистых веществ сыра.

Во ВНИИМС разработана методика для изучения качественного состава продуктов протеолиза в созревающих сырах методом гель-фильтрации высокого разрешения (методика ВНИИМС И 10.51.40-006-2016) [10]. Подготовка пробы согласно данной методике основывается на экстрагировании водой водорастворимых азотистых веществ из сухого обезжиренного препарата сыра. Для получения такого препарата сыр обезжиривается с помощью гексана и высушивается. На основании разработанной методики для изучения качественного состава продуктов протеолиза, были проведены работы по разработке экспрессной методики определения количественного содержания продуктов протеолиза в сыре. Был использован разработанный метод приготовления сухого обезжиренного препарата сыра с последующей экстракцией водорастворимых азотистых соединений водой. Для определения степени протеолиза был выбран метод формольного титрования [11], который давно используется во ВНИИМС в исследованиях по определению содержания азота аминокислот и низших пептидов в гидролизатах молочных белков. Метод формольного титрования показывает хорошие показатели по воспроизводимости и точности определения при правильной подготовке пробы. Анализируемая проба должна иметь низкую буферность по кислоте и щелочи, что достигается при условии низкого содержания обладающих буферными свойствами солей и негидролизированных белков в пробе.

Недостатком метода подготовки экстракта водорастворимых азотистых веществ по методике ВНИИМС И 10.51.40-006-2016 является большая продолжительность приготовления обезжиренного сухого препарата сыра, которая составляет 1 или 2 рабочих дня. Исходя из этого, возник вопрос о необходимости сокращения продолжительности подготовки пробы. Был проведен поиск литературных источников, касающихся методов подготовки пробы для определения степени зрелости сыров. По результатам обзора литературы, перспективным был признан метод, использованный в исследованиях Vakaleris et al [1], [5], где для определения содержания продуктов протеолиза в сырах применялся метод формольного титрования. Методика экстрагирования водной вытяжки продуктов протеолиза для определения содержания водорастворимых форм азота в сырах в соответствии с прописью Vakaleris et al [5] занимает значительно меньшее время, чем методика экстрагирования, применяемая во ВНИИМС.

Приготовление экстракта, содержащего водорастворимые азотистые вещества согласно Vakaleris et al [5] производится следующим образом. Навеску из 10 г натертого сыра смешивают с 40 мл 0,5 М раствора цитрата натрия. К смеси приливают 80 мл дистиллированной воды и обрабатывают на лабораторном миксере для получения гомогенной смеси. Полученную смесь количественно переносят в мерную колбу на 200 мл и доводят объем смеси в колбе до метки дистиллированной водой. Содержимое колбы должно иметь температуру около 20 °С. Отбирают 100 мл полученной смеси, помещают в колбу и приливают 10 мл 1,41 N раствора HCl. Содержимое колбы перемешивают. Объем в колбе доводят до 125 мл добавлением дистиллированной воды. Активная кислотность полученной смеси должна быть равна $(4,40 \pm 0,05)$ ед. рН. Подкисленную смесь фильтруют на складчатом бумажном филь-

тре. Получают раствор, содержащий продукты гидролиза белков сырной массы, классифицируемые как «азот растворимый при рН 4,6». В полученном фильтрате проводят определение содержания массовой доли аминного азота стандартным способом, например, в соответствии с методикой по ГОСТ 13805-76 [11].

В изученной литературе по вопросам экстракции растворимых азотистых веществ из сыра указано, что при извлечении кислыми растворами в состав экстракта не переходит некоторая часть крупных пептидов [6], [8]. Т.о., возникла гипотеза, что изменение способа подготовки пробы для анализа методом формольного титрования может изменить результаты определения показателей, характеризующих степень зрелости сыров.

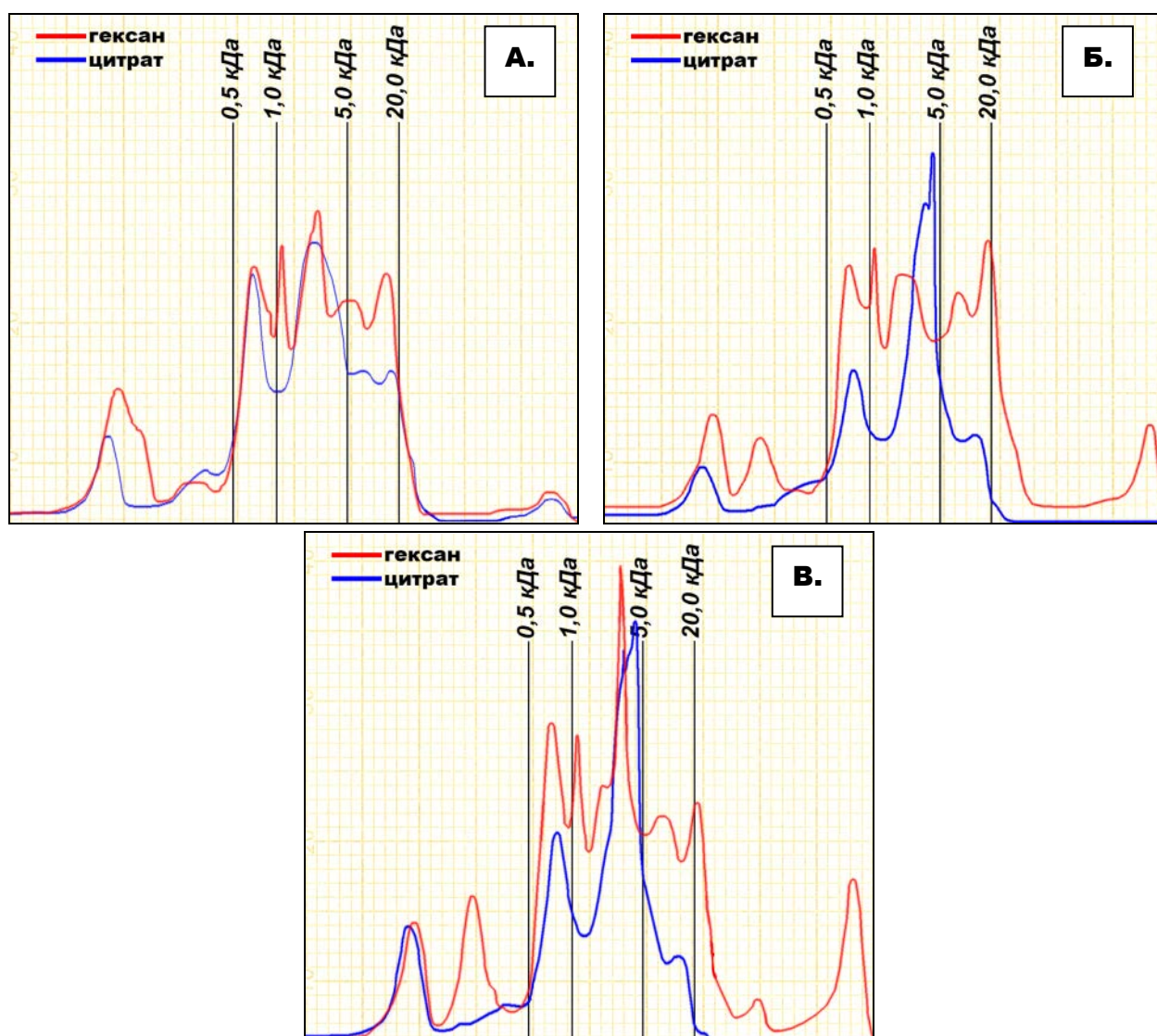


Рисунок 1. Молекулярно-массовое распределение азотистых фракций в экстрактах из сыров, полученных разными методами:
 А) Голландский зрелый + 3 мес. хранения – контроль сух СФ;
 Б) Голландский зрелый + 3 мес. хранения – жидкий СФ ВНИИМС;
 В) Голландский 17–1–3 + 1 год хранения – Chy-max M

Для уточнения вопроса было изучено влияние способа экстракции на степень извлечения азотистых веществ из сыра. Состав экстрактов, полученных разными

способами, исследовали методом гель-фильтрации высокого разрешения. Молекулярно-массовое распределение в экстрактах представлено на рисунке 1.

При анализе хроматограмм, приведенных на рисунке 1 видно, что при использовании способа экстракции, предложенного Vakaleris et al [5] отмечается снижение содержания отдельных водорастворимых фракций в экстракте. Также, в пробе, получаемой по данному методу, содержится значительная доля сухих веществ эмульгирующей соли. Массовая доля цитрата натрия в растворе составляет 1,9 %, при общем содержании сухого вещества в экстрактах в диапазоне 2,3–2,9 %. Это приводит к снижению содержания азотистых веществ в пробе, повышению буферности пробы и снижению точности результата определения аминного азота методом формольного титрования.

Для устранения указанных недостатков была проведена доработка метода экстракции, предложенного Vakaleris et al. В качестве эмульгирующей соли выбрана фосфатная добавка «Фонакон» (смесь фосфорнокислых солей натрия: E 451i, E 450i, E 450ii, E 339i, E 339ii), которая является более эффективным эмульгатором, чем цитрат натрия. Это позволило снизить количество вносимой эмульгирующей соли в 4 раза (в пересчете на сухое вещество). Также была увеличена в 2 раза навеска образца сыра, из которой производилась экстракция азотистых веществ. Теоретические меры, предпринятые для модификации метода, должны были в 8 раз увеличить содержание азотистых веществ в выделяемом экстракте, а также снизить буферную способность экстракта, влияющую на точность определения момента завершения титрования. Состав экстрактов, полученных разными способами, исследовали методом гель-фильтрации высокого разрешения. Молекулярно-массовое распределение в экстрактах представлено на рисунке 2.

Из анализа хроматограмм, представленных на рисунке 2, следует, что при экстрагировании водорастворимых азотистых веществ сыра с использованием фосфатной добавки «Фонакон» происходит снижение содержания азотистых веществ с молекулярной массой свыше 5 кДа. Содержание азотистых фракций с меньшим весом не изменяется.

Результаты по содержанию аминного азота сыров, полученные методом формольного титрования при использовании разных методов экстракции, приведены на рисунке 3.

Из данных, приведенных на рисунке 3 следует, что при изменении метода экстракции (от экстракции водой к экстракции сначала с раствором цитрата натрия и, далее, к экстракции с раствором смеси фосфатов) изменяется содержание аминного азота в пробе, полученной из одного и того же образца. Как следует из данных хроматографических исследований, приведенных на рисунках 1 и 2 при экстрагировании кислыми растворами (методы с предварительным эмульгированием образцов цитратом натрия и добавкой «Фонакон») в экстракте увеличивается относительная доза азотистых фракций с низким молекулярным весом (5 кДа и менее), представленных короткими пептидами и свободными аминокислотами. Подобные азотистые вещества имеют на единицу веса значительно большее количество свободных аминогрупп, чем белки и крупные пептиды. Теоретически, при титровании таких экстрактов, могут быть получены более высокие результаты по содержанию аминного азо-

та, чем при титровании смеси из белков и крупных пептидов при равном содержании общего азота в каждом из этих экстрактов.

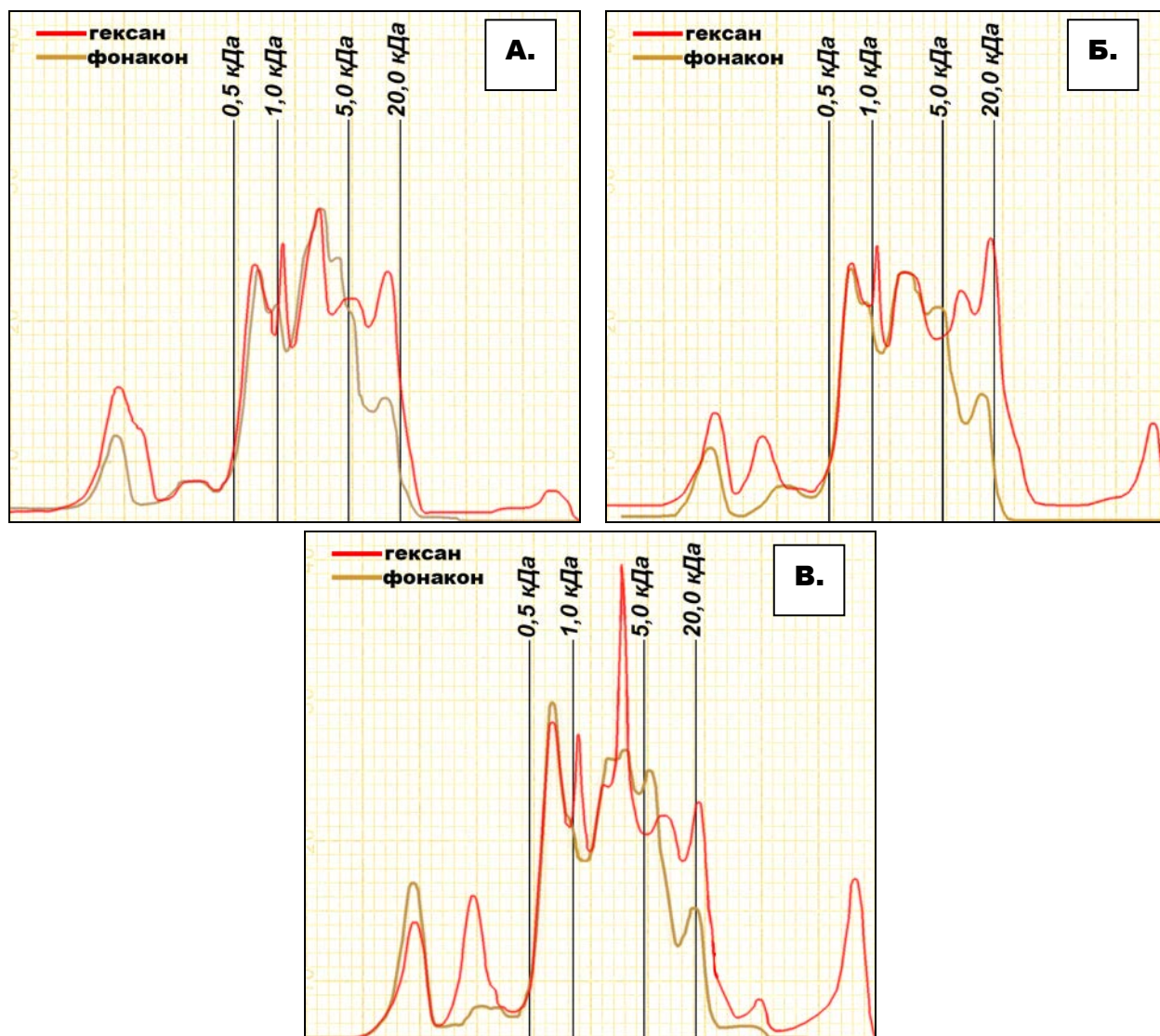


Рисунок 2. Молекулярно-массовое распределение азотистых фракций в экстрактах из сыров, полученных разными методами:
 А) Голландский зрелый + 3 мес. хранения – контроль сух СФ;
 Б) Голландский зрелый + 3 мес. хранения – жидкий СФ ВНИИМС;
 В) Голландский 17–1–3 + 1 год хранения – Chy-max M

Для уточнения влияния молекулярно-массового распределения азотистых веществ в экстрактах, полученных разными методами, были определены корреляционные зависимости между содержаниями отдельных азотистых фракций с разным молекулярным весом, и результатом определения аминного азота в пробе методом формольного титрования. Результаты приведены в таблице 1.

Из данных таблицы следует, что изменение содержания отдельных азотистых фракций в основном не сказывается на результате определения содержания аминного азота в пробе. Содержание аминного азота значимо коррелирует с только содержанием азотистых фракций массой менее 5 кДа ($R=0,83$), и более ни с какой азотистой фракцией. Следовательно, некоторое изменение состава азотистых веществ

в пробах при изменении способа экстрагирования не сказывается на результате определения аминного азота методом формольного титрования.

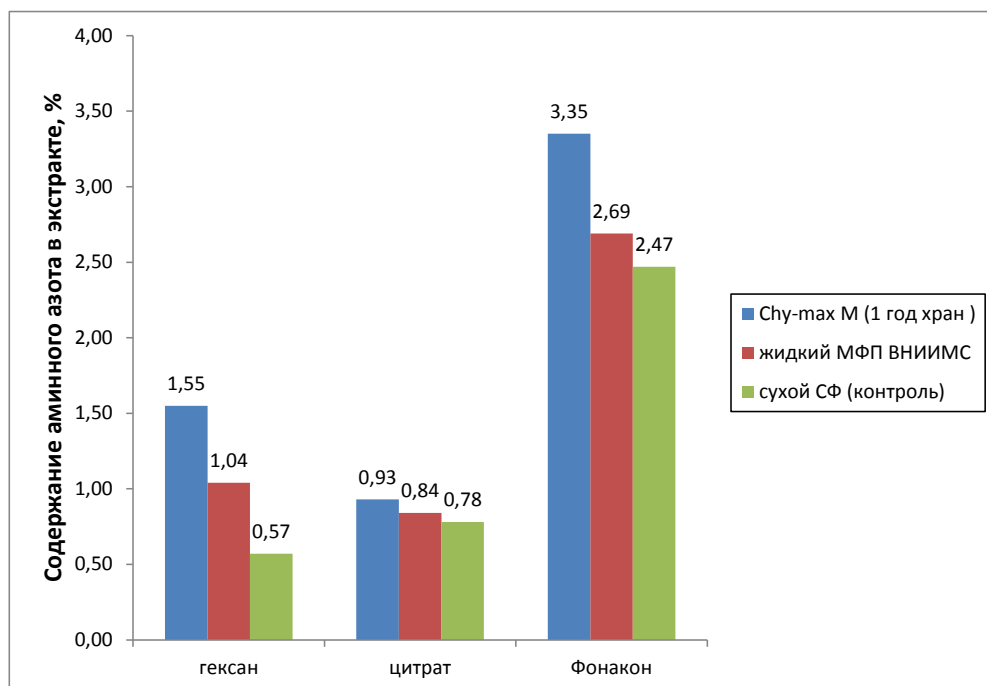


Рисунок 3. Результаты определения содержания аминного азота в экстрактах, полученных из сыров по разным методикам

Таблица 1

Молекулярно-массовое распределение азотистых веществ и содержание аминного азота в экстрактах, полученных из сыров разными методами

Образец	Реактив, применяемый для экстракции	Доля азотистой фракции молекулярной массой					Массовая доля аминного азота, %
		>20 кДа	5–20 кДа	1–5 кДа	0,5–1 кДа	<0,5 кДа	
Сhy-max M (1 год хранения)	Гексан	21,3 %	17,4 %	30,7 %	15,8 %	14,7 %	1,55
Жидкий МФП ВНИИМС	Гексан	16,0 %	22,3 %	29,5 %	16,1 %	16,1 %	1,04
Сухой СФ (контроль)	Гексан	7,3 %	22,7 %	33,8 %	17,6 %	18,7 %	0,57
Сhy-max M (1 год хранения)	Фосфатная добавка «Фонакон»	3,0 %	15,7 %	40,5 %	23,5 %	17,3 %	3,35
Жидкий МФП ВНИИМС	Фосфатная добавка «Фонакон»	0,7 %	16,8 %	43,5 %	24,8 %	14,3 %	2,69
Сухой СФ (контроль)	Фосфатная добавка «Фонакон»	1,1 %	14,9 %	45,5 %	22,1 %	16,3 %	2,47
Сhy-max M (1 год хранения)	Цитрат натрия	0,9 %	10,8 %	46,1 %	18,4 %	23,8 %	0,93

Продолжение таблицы 1

Образец	Реактив, применяемый для экстракции	Доля азотистой фракции молекулярной массой					Массовая доля аминного азота, %
		>20 кДа	5–20 кДа	1–5 кДа	0,5–1 кДа	<0,5 кДа	
Жидкий МФП ВНИИМС	Цитрат натрия	0,3 %	13,1 %	48,8 %	18,4 %	19,5 %	0,84
Сухой СФ (контроль)	Цитрат натрия	9,5 %	18,9 %	38,7 %	18,6 %	14,3 %	0,78
Коэффициент корреляции с содержанием аминного азота в пробе (R)		-0,29	-0,24	0,22	0,83	-0,34	

На основании приведенных данных можно сделать вывод, что предложенная модификация метода подготовки пробы для формольного титрования работоспособна и может быть использована для определения степени зрелости сыра. На практике это может быть использовано для установления сроков окончания хранения сыров, прогнозирования сроков хранения сыров, сравнения динамики созревания сыров при разных условиях хранения, служить методом объективного контроля в дополнение к результатам органолептической оценки сыра.

Список использованной литературы:

1. Vakaleris, D.G. A study of the ripening of Dariworld and Cheddar cheese with special emphasis on proteolysis / D.G. Vakaleris, N.F. Oison, W.V. Prie, S.G. Knight // J Dairy Sci. 1960. Vol. 43. P. 1058–1067.
2. El Soda, M. Acceleration of cheese ripening by the addition of whole cells or cell free extracts from Lactobacillus casei to the cheese curd / M. El Soda, M.J. Desmazeaud, S. Aboudonia, N. Kamal // Milchwissenschaft. 1981. Vol. 36. P. 140–142.
3. Polychroniadou, A. A simple procedure using trinitrobenzene sulphonic acid for monitoring proteolysis in cheese / A. Polychroniadou // J. Dairy Res. 1988. Vol. 55. P. 585–596.
4. Pearce, K.N. Ninhydrin assay for proteolysis in ripening cheese / K.N. Pearce, D. Karahalios, M. Friedman // J. Food Sci. 1988. Vol. 53. P. 432–435, 438.
5. Vakaleris, D.G. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening / D.G. Vakaleris, W.V. Price // J. Dairy Sci. 1959. Vol. 42. P. 264–276.
6. Mcsweeney, P.L.H. Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening / P.L.H. Mcsweeney, P.F. Fox // Le Lait. 1997. Vol. 77 (1). P. 41–76.
7. Kuchroo, C.N. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures / C.N. Kuchroo, P.F. Fox // Milchwissenschaft. 1982. Vol. 37. P. 331–335.
8. Reville, W.J. Soluble protein in Cheddar cheese. A comparison of analytical methods / W.J. Reville, P.F. Fox // Irish J Food Sci Technol. 1978. Vol. 2. P. 67–76.
9. Harwalkar, V.R. Isolation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese / V.R. Harwalkar, J.A. Elliott // J. Dairy Science. 1971. Vol. 54. P. 8–11.
10. И 10.51.40-006-2016 Методика определения молекулярно-массового распределения растворимых форм азотистых веществ сыра методом гель-фильтрации высокого разрешения, разработанная ВНИИ маслоделия и сыроделия, утвержденная директором ФГБНУ ВНИИМС 03.08.2016.
11. ГОСТ 13805-76. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия. – М.: Издательство стандартов, 1981. – 20 с.