Состав и особенности ферментов (энзимов)

Наряду с основными специфическими веществами (белки, липиды, углеводы) и минеральными солями в состав молока входят соединения, играющие важную роль в жизнедеятельности человека. Их часто объединяют в группу биологически активных веществ. К ним относят ферменты, витамины и гормоны.

В молоке имеются нативные (истинные) ферменты, которые попадают в него из секреторных клеток молочной железы, или непосредственно переходят из крови. Из молока, полученного от здоровых животных при нормальных условиях их содержания, выделено более 20 нативных ферментов различных классов. Кроме нативных ферментов в молоке содержатся многочисленные ферменты микробного происхождения (внеклеточные и внутриклеточные), продуцируемые микрофлорой молока и бактериальных заквасок, используемых при производстве кисломолочных продуктов, а также попадающей в молоко из воздуха и других источников в процессе получения, хранения и транспортировки молока. Некоторые ферментные препараты (сычужный фермент, пепсин и др.) специально вносят в молоко при производстве молочных продуктов. Таким образом, ферменты имеют как нативное, так и бактериальное происхождение, что обуславливает различие их свойств и влияние на качество молочных продуктов. Ферменты, встречающиеся в молоке и молочных продуктах, имеют большое практическое значение. Так, некоторые ферменты могут вызвать глубокие изменения составных частей молока во время хранения с возникновением различных пороков вкуса и запаха, что приводит к снижению пищевой ценности. Распад липидов, белков и углеводов при производстве молочных продуктов и сыров происходит под воздействием целого ряда липолитических, протеолитических, окислительно-восстановительных и других ферментов. В зависимости от химической структуры и специфического действия на различные субстраты ферменты подразделяются на классы (по Инихову):

* гидролазы и фосфорилазы;
* ферменты расшепления;
* окислительно-восстановительные.

На действии класса гидролаз и окислительно-восстановительных ферментов основано производство кисломолочных продуктов и сыров. Кроме того, по активнсти некоторых нативных бактериальных ферментов можно судить о санитарно-гигиеническом состоянии сырого молока (по редуктазе) и эффективности пастеризации (по фосфатазе и пероксидазе).

Первый класс - гидролазы и фосфорилазы

К ним относятся липаза, фосфатаза, протеиназа, редуктаза, рибонуклиаза, лизоцим. Липаза – липолитический фермент. В молоке содержится нативная и бактериальная липаза, она катализирует гидролиз триглицеридов молочного жира, с выделением низкомолекулярных жирных кислот. Фермент связан с казеином и иммуноглобулином, и лишь небольшая часть адсорбируется оболочками жировых шариков. При распределении липазы с белков на оболочки шариков жира, в случае создания определённых условий, наступает гидролиз жира, т.е. разложение жира на глицерин и жирные кислоты, что приводит к омылению и прогорканию молока и молочных продуктов.

Образующийся при гидролизе молочного жира глицерин, путём отщепления двух атомов водорода, может превратиться в глицериновый альдегид и разлагаться дальше. Разложение жирных кислот идёт путём окисления за счёт кислорода воды до образования уксусной кислоты, углекислого газа. Разложение молочного жира, вызываемого липазой в совокупности с другими факторами, сопровождается образованием промежуточных и конечных продуктов. Например, липоиды, в частности лецитин, подвергаются разложению, как ферментами микроорганизмов, так и др. катализаторами, в частности железом, что придаёт продуктам неприятный селёдочный привкус.

Липаза истинная (нативная) инактивируется при Т 74-80°С, бактериальная – 85-90°С. Нативная липаза теряет активность при температуре хранении молока от 0 до 5°С через 48 часов, но при повышении кислотности молока и молочного жира активность её возрастает.

Как правило, прогорклый вкус молока и молочных продуктов вызывает липаза, выделяемая посторонней микрофлорой молока – микрококками.

В то же время при производстве сыров камамбер, рокфор и др. участвует в формировании вкуса и запаха липаза, выделяемая специфической микрофлорой: молочнокислые палочки, лактококки и термофильный стерптококк.

Фосфатаза

В свежевыдоенном молоке обнаружена щелочная фосфатаза, секретируемая клетками молочной железы, но может и микроорганизмами.

Инактивируется фосфатаза при температуре 63°С с выдержкой 30 мин или 72-74°С без выдержки. Это положено в основу метода контроля эффективности пастеризации молока и сливок при невысоких температурах тепловой обработки (проба на фосфатазу).

В меньшем количестве содержится в молоке кислой фосфатазы, которая устойчива к температурам и инактивируется лишь при 97°С с выдержкой 6-4 сек. Лактаза катализирует реакцию гидролитического расщепления лактозы на моносахариды: глюкозу и галактозу. Клетки молочной железы лактазу практически не синтезируют, её вырабатывают молочнокислые бактерии и дрожжи некоторых форм. Оптимальное действие лактазы при рН 5,0. Фермент применяют при выработке гидролизованной сыворотки, используемой в хлебобулочной и кондитерской промышленности. В медицине фермент применяют при нарушении пищеварения, связанного с непереносимостью к лактозе.

Амилаза в молоке содержится в форме α-амилаза, связана с β-лактоглобулиновой фракцией молока. Количество амилазы в молоке повышается при заболевании животных. Инактивируется при температуре пастеризации. Лизоцим катализирует гидролиз в полисахаридах клеточных стенок некоторых видов бактерий. Обладая, таким образом, антибактериальными факторами, лизоцим обуславливает бактерицидные свойства молока. Содержится лизоцим в молоке в небольших количествах (среднее значение 13мк/г в 100см3). Он является основным белком, с молекулярной массой 18000, оптимум действия рН 7,9, термостабилен в кислой среде.

Лизоцим принадлежит к группе иммуномодуляторов-пробиотиков, повседневное применение которых позволяет обеспечить безмедикоментозную коррекцию деятельности многих систем организма.

Протеиназы в молоке обнаружены нативные и бактериальные, которые отличаются строением каталитического центра. Все они вызывают гидролиз пептидных связей белков молока в основном α- и β- казеина, образуя пептоны, пептиды и аминокислоты.

протеиназа

R1- CO - NH – R2 +H2 O → R1 COOH + R2 NH2

Нативная протеиназа молока близка по строению к плазме крови и из неё попадает в молоко. Она вызывает гидролиз β- казеина с образованием γ-казеина. Фермент инактивируется при 70°С 10 мин или 90°С – 5мин.

Бактериальная протеиназа вырабатывается микрофлорой молока микрококками, гнилостными бактериями, которые выделяют активные протеиназы, вызывающие различные пороки вкуса и запаха (гнилостный и др.).

Молочнокислые бактерии заквасок (лактококки и лактобациллы) выделяют активные протеиназы, которые имеют большое значение при производстве кисломолочных продуктов и сыров. Они формируют специфический вкус, консистенцию, рисунок сыров, повышая биологическую и пищевую ценность продуктов.

Второй класс – Ферменты расщепления

Рибонуклеаза по аминокислотному составу и свойствам аналогична рибонуклеазе поджелудочной железы. В молоко фермент попадает из крови животного. Рибонуклеаза молока катализирует расщепление рибонуклеиновой кислоты на нуклеотиды.

Третий класс – окислительно-восстановительные ферменты

Окисление в организмах рассматривается как процесс отнятия водорода, благодаря чему вещество окисляется. Отнятый водород передаётся другому веществу, в силу чего оно восстанавливается. Таким образом, при участии ферментов микроорганизмов происходит одновременно окисление одного вещества и восстановление другого. Этот процесс и ферменты получили название окислительно-восстановительные. К ним относятся дегидрогеназы, оксидазы, в т.ч. ксантиоксидаза, пероксидаза, каталаза и др. лактодегидразы.

Дегидрогеназы обнаружены в молоке в небольших количествах в виде нативных (истиных). Они являются катализаторами дегидрирования, при этом перенос атомов водорода осуществляют пиридиновые и проч. Коферменты.

Дегидразы различают анаэробные и аэробные. Анаэробные передают отнятый водород любому веществу, кроме кислорода воздуха. Аэробные передают водород непосредственно кислороду воздуха.

Многочисленные дегидрогеназы накапливаются в сыром молоке при размножении в нём бактерий. Они называются редуктазами бактериального происхождения. Активность редуктаз и, как следствие, бактериальную обсеменённость молока определяют по продолжительности восстановления, т.е. обесцвечивания добавленного к молоку метиленового голубого или резазурина по редуктазной пробе. (ГОСТ 9225-84)

Редуктаза относится к анаэробным ферментам, она активна до температуры нагревания молока 60°С, инактивируется при температуре 75°С с выдержкой 5 мин. Все дегидрогеназы, вырабатываемые молочно-кислыми бактериями и дрожжами бактериальных заквасок, принимают активное участие в молочнокислом и спиртовом брожении.

Оксидазы. К ним относится ксантиоксидаза из молочной железы и оксидазы, продуцируемые микрофлорой молока. Ксантиоксидаза катализирует окисление молекулярным кислородом пуриновых оснований до молочной кислоты, а также различных альдегидов до карбоновых кислот.

Ксантиоксидаза может передавать водород, отнятый у субстрата как кислороду воздуха, так и метиленовому голубому, т.е. происходит окисление. Этот фермент содержит железо и молибден, его содержание в молоке высокое.

Пероксидаза. Нативная пероксидаза молока продуцируется клетками молочной железы. Часть её может высвобождаться из лейкоцитов. Фермент содержится в молоке в больших количествах, от 30 до 100мг/дм3. Он обладает антибактериальными свойствами. Пероксидаза термостабильна, инактивируется при 80 °С в течение 25 сек., катализирует окисление различных органических соединений перекисью водорода и может окислять некоторые неорганические соединения., например йодид калия.

2КJ + Н2 О2 → пероксидаза → 2КОН + J2

Данную реакцию используют в молочной промышленности для определения эффективности высокотемпературной пастеризации по йодокрахмальной пробе. Если реакция будет положительна, то в молоке присутствует пероксидаза и, следовательно, молоко либо не пастеризовано, либо подвергалось термообработке при температуре ниже 80°С.

Каталаза. Нативная каталаза переходит в молоко из клеток молочной железы, а также продуцируется микрофлорой молока и лейкоцитами. В молоке здоровых коров каталазы содержится мало, В молозиве и молоке больных животных её количество резко увеличивается.

Каталаза катализирует окисление перекиси водорода до 2-х молекул воды и кислорода. Определение активности каталазы используется как метод обнаружения молока, полученных от больных коров( мастит или др. заболевания вымени).

Витамины

Витамины – это низкомолекулярные соединения, разнообразного химического строения, необходимые для нормальной жизнедеятельности животных, человека, растений и микроорганизмов. В молоке содержатся все жизненно важные витамины, хотя содержание некоторых из них в недостаточном количестве. Большинство витаминов поступает в организм коровы с кормом, часть – синтезируется микрофлорой рубца. Содержание витаминов в сыром молоке зависит от кормовых рационов, времени года, физиологического состояния, породы и индивидуальных особенностей животного.

Гормоны

В молоко из крови переходят эндогенные гормоны, выделяемые эндокринными железами животного, и экзогенные гормоны, т.е. гормональные препараты, применяемые для стимулирования молочной продуктивности, развития животных, усвоения кормов и т. д.

По химическому строению некоторые из этих гормонов являются пептидами и белками, большая группа имеет стероидную структуру и третьи – производные аминокислот и жирных кислот. К пептидным относят гормоны: пролактин (лактогенный гормон), стимулирующий развитие молочных желёз, образование и секрецию молока; окситоцин, который повышает синтез белка в молочной железе и стимулирует секрецию молока, и соматропин, ускоряющий рост и увеличивающий массу тела.

Стероидные гормоны – кортикостероиды оказывают значительное влияние на обмен углеводов и белков, андрогены - мужские половые гормоны, эстрогены – женские. Они также вызывают рост молочных желёз, влияют на белковый, жировой и водно-солевой обмен.

К третьей группе (производные амино- и жирных кислот) относят тироидные гормоны, которые принимают активное участие в регулировании биохимических процессов в рубце, способствует повышению массовой доли жира в молоке, и простагландин.

##### Пигменты

Пигменты принадлежат к веществам, сопутствующим жиру молока. Они в основном растворены в молочном жире, частично входят в состав липидов оболочек жира.

Желтая окраска молочного жира обусловлена наличием веществ, называемых каротиноидами, К ним относятся углеводороды – каротины α, β, γ и спирты-ксантофиллы. Каротины в молоке содержатся в пределах от 0,05 до 0,09 мг/кг, ксантофиллы – только следы.

##### Газы

Молоко при получении, хранении, транспортировке и обработке соприкасается с воздухом, газы которого растворяются в нём согласно общим законам растворимости газов в воде. Общее содержание газов в 1 кг молока составляет от 60 до 120 мг, из них на долю СО2 приходится от 60 до 70%, кислорода – 6 – 10%, азота – 25 –30%. В молоке содержится также небольшое количество аммиака, которое называют нативным. После дойки содержание газов в молоке устанавливается на определённом постоянном уровне. В процессе хранения, при транспортировке и обработке молока количество отдельных газов в нём меняется. Например, при хранении молока даже при низких температурах вследствие развития гнилостных микроорганизмов и расщепления белков до аминных групп, количество аммиака увеличивается, а кислорода понижается.

В процессе очистки, перекачивания, при транспортировке молока количество кислорода в нём может повыситься, что способствует увеличению окислительно-восстановительного потенциала и появлению в молоке во время хранения окисленного вкуса. При пастеризации молока, наоборот, растворённый кислород и углекислый газ улетучиваются, что сопровождается снижением окислительно-восстановительного потенциала и титруемой кислотности молока, как правило, на 1 градус Тернера.

Одновременно в ходе пастеризации повышается содержание аммиака в следствии воздействия на белки повышенных температур. Поэтому, метод определения наличия аммиака в молоке используется только для сырого молока, поскольку в пастеризованном его содержание превышает нативное.

###### Посторонние вещества и пути попадания их в молоко

Проблема загрязнения кормов и пищевых продуктов посторонними веществами является одной из серьёзнейших в настоящее время, поскольку многие их них являются токсичными для животных и человека, вызывая пищевые отравления и пищевые инфекции. Кроме этого, некоторые из них представляют опасность в последствии, так как обладают гепатотропным, канцерогенным и мутагенным действием. С точки зрения, охраны здоровья человека к посторонним веществам относятся:

* антибиотики, пестициды, токсичные химические элементы, радионуклиды, нитраты, нитриты, микотоксины, бактериальные яды. Кроме токсичности эти вещества отрицательно влияют на технологический процесс производства молочных продуктов, что приводит к увеличению затрат сырья и снижению их качества и пищевой ценности.

Антибиотики (пенициллин, стрептомицин, левомицетин, тетрациклин, окситетрациклин др.) применяют в животноводстве с целью профилактики заболеваний и для лечения больных сельскохозяйственных животных. Кроме того, антибиотики-стимуляторы добавляют в корм для улучшения его усвояемости и стимуляции роста животных.

При лечении животных антибиотики вводят внутримышечно или непосредственно в пораженные бактериальными инфекциями доли молочной железы лактирующих животных. Доказано, что введённые антибиотики переходят в молоко в количестве от 10 до 50% используемой дозы в течение 48-72 часов и более после инъекции. Содержание антибиотиков в молоке зависит от дозы, свойств, применяемого препарата, молочной продуктивности и индивидуальных особенностей животного.

Тепловая обработка молока незначительно разрушает антибиотики. Они снижают санитарные качества и технологические свойства молока, искажают результаты редуктазной пробы, повышая его классность по бактериальной обсеменённости и сортность молока более низкого качества.

Использование молока с остатками пенициллина и других препаратов может вызывать дисбактериоз и аллергические реакции у людей с повышенной чувствительностью, а также возникновение у патогенных микроорганизмов резистентности к этим препаратам. Присутствие антибиотиков в молоке даже в небольших количествах, подавляет развитие молочнокислых бактерий, применяемых при производстве кисломолочных продуктов. Наиболее чувствительными к антибиотикам являются термофильный стрептококк и лактобациллы; мезофильные лактококки обладают меньшей чувствительностью.

В то же время посторонняя патогенная микрофлора (стафилококк, сальмонелла, дизентерийная палочка и др.) менее чувствительна к антибиотикам. Антибиотики нарушают сычужное свёртывание молока при производстве творога и сыра, что отрицательно влияет на консистенцию и вкус молочных продуктов. Горький и невыраженный вкус характерен для масла сладкосливочного, выработанного из сливок с большим содержанием антибиотиков. С целью профилактики молоко, полученное в течение 5 дней после введения антибиотиков, запрещено сдавать на молочные заводы для переработки. Пестициды в молоко попадают через загрязнённый корм или через кожу при санитарной обработке шерстного покрова животных против насекомых. Для этой цели используют фосфорорганические и карбаматные пестициды, в прошлые годы - хлорорганические. Степень перехода в молоко и токсичность этих групп соединений различна. Фосфорорганические и карбаматные пестициды (карбофос, хлорофос, фосфамид, севин и др.) очень быстро разрушаются в организме животного, не выделяются с молоком или выделяются в небольших количествах.

Хлорорганические пестициды (ДДТ, альдрид, ГХГЦ и его изомеры) обладают высокой стойкостью во внешней среде. При поступлении в организм животного они аккумулируются в жировой ткани, и длительное время выделяются с молоком. Моющие и дезинфицирующие вещества попадают в молоко и молочные продукты при недостаточном ополаскивании водой доильных установок и оборудования для первичной обработки молока, хранения и транспортировки. Соблюдение инструкций по мойке и санитарной обработке технологического оборудования, резервуаров и автомолцистерн позволит избежать попадания этих веществ в молоко. Однако в случае сбоя в работе автоматики при безразборной мойке технологического оборудования такое загрязнение возможно.

Наличие моющих и дезинфицирующих веществ в молоке приводит к нарушению процессов сквашивания при производстве кисломолочных продуктов и сыров. Токсичные элементы. К ним относятся тяжёлые металлы и мышьяк. Некоторые из них (свинец, ртуть, кадмий) и мышьяк высокотоксичны и подлежат регламентированию; другие (медь, цинк, олово, железо) токсичны только при высоких концентрациях, поэтому их содержание должно быть ограничено.

Загрязнение молока наиболее токсичными тяжелыми металлами, радиоактивными элементами происходит по схеме: выбросы и отходы промышленных предприятий, транспорта и др. в атмосферу, водоёмы, переходят в почву, затем в растения, в организм животных и в молоко и молочные продукты. Отравление коров ртутью также возможно при использовании кормов, протравленных ртутьсодержащими и мышьяковистыми препаратами. Однако биологические системы коров нейтрализуют поступившие с кормом токсичные вещества и в молоко выделяется лишь незначительная их часть. Поэтому молоко по сравнению с другими пищевыми продуктами (мясо, рыба, птица) меньше загрязнено тяжелыми металлами и мышьяком. Однако их концентрация в молоке нормируется, Предельно допустимые концентрации для молока и молочных продуктов установлены в санитарно-гигиенических нормах и правилах. Свинец является одним из самых распространённых токсичных элементов. В организме человека он блокирует ферментные системы, влияет на биосинтез гемоглобина и депонируется в костной ткани.

Ртуть самый высокотоксичный элемент, Предположительно попадание метилртути в молоко связано с использованием для кормления рыбной муки и зерна, протравленного ртутьсодержащими препаратами.

Кадмий оказывает сильное токсическое действие на организм животных и человека. Источником является сжигание топлива на ТЭЦ, минеральные фосфорсодержащие удобрения.

Мышьяк ядовит только при высоких концентрациях. Источником загрязнения являются электростанции, работающие на буром угле, применение мышьякосодержащих удобрений. Мышьяк может содержаться в полифосфатах, используемых при производстве плавленых сыров.

Радиоактивные изотопы. Выделяются в атмосферу при добыче, использовании, хранении радиоактивного топлива и испытании ядерного оружия. Молоко загрязняется наиболее опасными радионуклидами: (Sr) стронций 90, (Sr) стронций 89, (Cs) цезий 137, особенно для детей - (I) йод 131, который аккумулируется в щитовидной железе. Молоко загрязнённое радиоактивными веществами лучше перерабатывать на масло сливочное и топлёное, так как в жир уходит менее 1% изотопов или сыр.

Нитраты, нитриты и нитрозамины не обладают выраженной токсичностью, но при высокой дозе могут вызвать отравление животных и людей. Кроме того, они опасны для человека, так как являются предшественниками синтеза канцерогенных веществ в организме и пищевых продуктах.

Снизить содержание нитратов и нитритов в молоке можно путём гомогенизации, приводящей к повышению активности ксантиоксидазы, обладающей нитратредуктазной и нитритредуктазной активностью, а также добавлением к нему аскорбиновой кислоты.

Микотоксины. Проблема загрязнения пищевых продуктов природными токсинами, вырабатываемые плесневыми грибами и бактериями, приобрела в последние десятилетия особенное значение. Опасность отдалённых последствий имеют канцерогенные микотоксины, отдельные из них могут представлять смертельную опасность.

Развитие в кормах и пищевых продуктах некоторых видов плесневых грибов способствуют накоплению в них микотоксинов – афлактоксинов, охратоксинов и др., которые обладают хроническим воздействием. Скармливание заплесневелых кормов, поражённых микроскопическими грибами (Aspergilus, Fusarium), а также синтезирующие наиболее опасные афлатоксины Asp.flavus, u Asp.paraciticus, может привести к отравлению животных и выделению части микотоксинов в молоко.

Наиболее опасен афлатоксин В1, который в организме животных переходит в метаболит М1 , и попадает в молоко. При пастеризации молока концентрация его снижается незначительно.