

УДК 637.1

ИНАКТИВАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ КАК ИНДИКАТОР ТЕПЛОВОЙ ОБРАБОТКИ МОЛОКА

С.А. Сальников, 2 курс

Научный руководитель – **И.В. Бубырь**, к.тех.н., доцент
Полесский государственный университет

Инактивация ферментов в молоке – надежный биохимический индикатор проведенной термической обработки, при которой наряду с их разрушением происходит гибель патогенной микрофлоры.

Щелочная фосфатаза на протяжении многих лет служит стандартным индикатором адекватной пастеризации молока. Однако внедрение более высоких температур пастеризации, а также щадящих режимов обработки (термизация), создало потребность в дополнительных тестах, позволяющих ретроспективно оценить характер теплового воздействия на молоко.

В связи с этим другие ферменты, естественно присутствующие в молоке, также рассматриваются как потенциальные маркеры температурной истории продукта [1].

Группой ученых было проведено детальное кинетическое исследование щелочной фосфатазы, лактопероксидазы и бета-лактоглобулина в контексте идентификации внутренних время-температурных индикаторов для контроля тепловой обработки молока. Установлено, что тепловая инактивация или денатурация щелочной фосфатазы, лактопероксидазы и бета-лактоглобулина в изотермических условиях подчиняется кинетике первого порядка, хотя существуют исключения, вызванные наличием нескольких ферментов (например, изоферментов) и другими факторами, такими как протеолиз [2, 3].

Щелочная фосфатаза (ALP), традиционно используемая как показатель адекватной пастеризации, показала почти полную потерю активности при температурах выше 70 °С в течение 15 секунд, причем результаты лабораторных и пилотных исследований были практически идентичны [1]. Термическая инактивация щелочной фосфатазы была охарактеризована z -значением 5,3 °С и D -значением при 60 °С, равным 24,6 минуты [2].

Согласно официальному заключению Европейского агентства по безопасности продуктов (EFSA), пастеризация сырого молока должна быть осуществлена при температуре не менее 72 °C в течение 15 секунд или при 63 °C в течение 30 минут, так чтобы тест на щелочную фосфатазу сразу после такой обработки давал отрицательный результат. Для коровьего молока отрицательным результатом считается измеренная активность ≤ 350 миллиединиц активности фермента на литр (mU/L) с использованием стандарта ISO 11816-1 [4].

Состав молока, включая содержание жира, концентрацию белка и наличие других компонентов, может влиять на термостабильность ALP [3].

Кислая фосфатаза оказалась очень термостабильным ферментом. Низкотемпературная длительная пастеризация при 62,8 °C в течение 30 минут приводила только к 10–20 % инаktivации, а для полной инаktivации требовалось 30 минут при 88 °C. Кислая фосфатаза сохраняла значительную активность после HTST-пастеризации и была стабильна в диапазоне от 65 до 80 °C при нагреве в течение 15 секунд, с небольшой или нулевой потерей активности при 80 °C [1].

Лактопероксидаза (LP) является вторым по распространенности ферментом в коровьем молоке после ксантиноксидазы [3]. Она была признана наиболее перспективным маркером для HTST-обработки в диапазоне выше 78 °C [1]. При нагреве с использованием пластинчатого теплообменника наблюдалось резкое снижение активности при температурах между 72 и 80 °C, причем фермент полностью инаktivировался при 78 °C в течение 15 секунд, и сохранял лишь следы активности после нагрева при 76 °C. D-значения составили 940,6 с при 70 °C, 47,7 с при 75 °C и 4,5 с при 80 °C, а z-значение – 5,4 °C. По данным Claeyс и других авторов (2001), для лактопероксидазы были получены z-значение 4,3 °C и D-значение при 71 °C, равное 38,6 секунды [2]. Наблюдалось восстановление активности лактопероксидазы после нагрева при 70 °C в течение 24 часов хранения при 4 °C, однако после нагрева до 75 °C восстановления не происходило, и инаktivация была необратимой. Инаktivация лактопероксидазы очень чувствительна к температуре [3].

Амилаза, изучаемая по декстринизирующей и осахаривающей активности, сохраняла активность после нагрева до 80 °C в течение 15 секунд в лабораторных условиях, но была менее стабильна при использовании пластинчатого теплообменника [1]. В молоке существуют две формы амилазы: α -амилаза с декстринизирующей активностью и β -амилаза с осахаривающей активностью. β -Амилаза выживает при HTST-пастеризации [3]. Декстринизирующая активность сохранялась примерно на 22 % после нагрева при 80 °C в течение 15 секунд. Осахаривающая активность имела D-значения 95,7 с при 70 °C, 50,9 с при 75 °C и 26,8 с при 80 °C, а z-значение составило 16,2 °C [1].

Каталаза оказалась термолабильным ферментом: в лабораторных условиях 50 % активности терялось при нагреве до 72 °C в течение 15 секунд, а на пилотной установке – уже при 66 °C. Уровни каталазы варьируют и повышаются при мастите [1].

Лизоцим и рибонуклеаза отнесены к высокотермостабильным ферментам. Рибонуклеаза показала небольшую потерю активности при нагреве до 80 °C в течение 15 секунд, но теряла около 40 % активности при нагреве на промышленной установке [1].

Ксантиноксидаза активируется при нагреве до 70 °C, что связано с переносом фермента из жировой фазы в водную. Активация не наблюдалась после хранения при 4 °C в течение 24 часов. При нагреве в теплообменнике фермент терял около 30 % активности при 80 °C в течение 15 секунд [1].

Помимо собственных ферментов молока, значительный интерес для молочной промышленности представляет термостабильность *бактериальных ферментов*, поскольку некоторые из них могут выживать после тепловой обработки и вызывать порчу молочных продуктов. Экстраклеточные протеиназы, липазы и фосфолипазы С, продуцируемые многими психротрофными бактериями рода *Pseudomonas*, а также некоторыми другими (например, *Flavobacterium*, *Aeromonas*), проявляют высокую термостабильность и остаются активными даже после ультравысокотемпературной (УНТ) обработки молока (например, 135–150 °C в течение нескольких секунд). Эти три класса ферментов могут действовать синергически: протеиназы гидролизуют белковую оболочку жировых шариков, липазы гидролизуют триглицериды, а фосфолипазы С гидролизуют фосфолипиды мембраны, что приводит к совокупному повреждению мембраны жировых шариков и развитию прогорклого вкуса и гелеобразованию в УНТ-молоке [6, 7].

Из всех изученных ферментов лактопероксидаза предлагает наиболее перспективный метод для обнаружения тепловой обработки порядка 76 °C в течение 15 с. Для денатурации бета-лактоглобулина были найдены z-значения 7,9 °C ($D_{75}^{\circ C} = 49,9$ минуты) в температурном диапазоне 70–80 °C и 24,2 °C ($D_{85}^{\circ C} = 3,53$ минуты) в диапазоне 83–95 °C. Для большинства ферментов термостабильность образцов, нагретых в пластинчатом теплообменнике, была ниже, чем для лабораторных образцов. Кинетика термической инактивации ALP может варьировать среди различных типов молока, что подчёркивает необходимость осторожности при использовании ALP в качестве универсального маркера пастеризации для всех типов молока и указывает на необходимость разработки видоспецифичных критериев пастеризации.

Список использованных источников

1. Griffiths M. W. Use of Milk Enzymes as Indices of Heat Treatment // *Journal of Food Protection*. 1986. Vol. 49 (9). P. 696-705. DOI: 10.4315/0362-028X-49.9.696.
2. Claeys W. L., Ludikhuyze L. R., Van Loey A. M., Hendrickx M. E. Inactivation kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase, and denaturation kinetics of beta-lactoglobulin in raw milk under isothermal and dynamic temperature conditions // *Journal of Dairy Research*. 2001. Vol. 68 (1). P. 95-107. DOI: 10.1017/S0022029901004678.
3. Tzereme A., Chatzioannou A., Gkatsi E., Vlachos D., Koutsimanis K. A Comparative Kinetic Study on Alkaline Phosphatase Thermal Inactivation in Different Milk Types // *Kinases Phosphatases*. 2025. Vol. 3 (2). Art. 11. DOI: 10.3390/kinasesphosphatases3020011.
4. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion: The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurisation // *EFSA Journal*. 2021. Vol. 19 (4). Art. e06578. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6578.
5. Wu G. F., Sha J., Shi Y. Review on the monitoring of heat damage in milk during heat treatment // *Journal of Dairy Science and Technology (China)*. 2007. Vol. 2. P. 13-18. (Доступно через CNKI: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-RPGY200702013.htm).
6. Stepaniak L., Soerhaug T. Thermal denaturation of bacterial enzymes in milk // *Heat-Induced Changes in Milk* (2nd ed.). Brussels: International Dairy Federation (IDF), 1995. IDF Document No. 9501. ISBN: 92 9098 003 7.
7. ScienceDirect / Elsevier. Heat Treatment of Milk // *Food Science Reference Module*. 2023. (Справочные материалы по пищевой технологии).