

УДК 637.141

*О.В. Доденко, В.П. Вистовская***Влияние соматических клеток на липолитическую активность и качественные показатели сырого коровьего молока***O.V. Dodenko, V.P. Vistovskaya***Influence of Somatic Cells on Lipolytic Activity and Quality Indicators of Crude Cow Milk**

Рассматривается влияние соматических клеток на качественные показатели молока. Дана биохимическая характеристика липазы.

**Ключевые слова:** химический состав молока, мастит, соматические клетки, липаза.

Influence of somatic cells on quality indicators of milk is considered. The biochemical characteristic of a lipase is given.

**Key words:** chemical composition of milk, mastitis, somatic cages, lipase.

Молоко представляет собой биологическую жидкость, которая образуется в молочной железе млекопитающих [1]. Химический состав молока животных не постоянен, он зависит от ряда факторов: породы и возраста коров, периода лактации и молочной продуктивности, времени года, кормления, условий содержания, индивидуальных особенностей, физиологического состояния и заболеваний коров, а также от условий получения, первичной обработки, хранения и транспортировки молока [2; 3].

В состав коровьего молока входят вода и сухой остаток, состоящий из лактозы, жира, белков и минеральных веществ. В молоке имеются нативные (истинные) ферменты, которые попадают в него из секреторных клеток молочной железы или непосредственно переходят из плазмы крови. Ферментный спектр секреторных клеток молочной железы очень разнообразен, поскольку ферменты катализируют различные обменные процессы, происходящие в ней. При этом отмечаются адаптивные изменения активности ферментов в зависимости от функционального состояния железы, что отражается на разнообразии ферментов, секретируемых с молоком [4].

Молоко здоровых коров при нормальных условиях содержит около 80 нативных ферментов различных классов. Около 15 из них находятся в свободном виде, около 20 ферментов связаны с мицеллами казеина и сывороточными белками и около 40 ферментов — с оболочками шариков жира. Некоторые ферменты находятся одновременно как в белковой, жировой, так и в водной фазе молока. Кроме нативных ферментов в молоке содержатся многочисленные ферменты микробного происхождения, продуцируемые микрофлорой вымени, а также попадающие в молоко из воздуха и других источников в процессе получения, хранения и транспортировки.

Различные заболевания коров ведут к снижению молочной продуктивности и изменению физико-химических показателей молока, в том числе его ферментной активности. Мастит — самое распространенное заболевание, поражающее молочную железу коров. Различают клинический мастит, при котором отмечаются видимые изменения молочной железы и молока, характеризующиеся очень высоким содержанием соматических клеток и патогенной микрофлоры, и субклинический мастит, который не имеет видимых признаков и диагностируется только по увеличению содержания соматических клеток по сравнению с нормальным молоком.

Количество соматических клеток в натуральном коровьем молоке — важный показатель его качества, определяющий пригодность молока для производства ряда молочных продуктов. Высокое содержание соматических клеток свидетельствует о заболевании маститом. В 1 см<sup>3</sup> нормального сырого коровьего молока содержится от 100 до 300 тыс. соматических клеток, из которых 90% составляют эпителиальные клетки, не более 8% — полиморфно-ядерные лейкоциты и лимфоциты и около 1% — макрофаги [5].

В соответствии с Федеральным законом № 88-ФЗ «Технический регламент на молоко и молочную продукцию» от 12.06.2008 требования к содержанию соматических клеток в молоке высшего сорта ужесточены — менее 200 тыс/см<sup>3</sup> [6]. Норма содержания соматических клеток в соответствии с требованиями СанПиНа 2.3.2.1078-01-1.2.1.1 составляет не более 500 тыс/см<sup>3</sup> [7].

В ряде стран с развитым молочным животноводством регламентированы допустимые уровни соматических клеток в коровьем молоке — сырье. Например, в Австрии, Австралии, Дании, Финляндии, Франции, Греции, Норвегии, Швеции и США для молока

1-го класса содержание соматических клеток должно составлять не более 200–250 тыс/см<sup>3</sup>, а для молока 2-го и 3-го классов — в основном не более 400 тыс/см<sup>3</sup> [8]. По данным европейских компаний, работающих в России: «Данон», «Кампина», «Онкен», «Эрманн», нормальное содержание соматических клеток в сыром молоке должно быть не более 300, 200, 250 и 300 тыс/см<sup>3</sup> соответственно. При воспалении молочной железы способность секреторных клеток к синтезу основных компонентов молока изменяется. При мастите снижается содержание в молоке сухих веществ, жира, казеина (в том числе  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеина), лактозы, витаминов В<sub>2</sub> и С, минеральных элементов — Р, Са, Mg, К. В то же время повышаются величина pH, количество лейкоцитов и других соматических клеток, общая бактериальная обсемененность, а также возрастает содержание хлоридов [9].

Повышенное содержание в молоке соматических клеток при заболевании коров маститом — потенциальный источник увеличения активности различных видов липаз, приводящих к гидролизу молочного жира. Липаза (триацилглицерол-ацилгидролаза) катализирует гидролиз триглицеридов молочного жира, действуя на сложноэфирные связи. Липаза молока обладает позиционной специфичностью и катализирует отщепление жирных кислот преимущественно в 1-м и 3-м положениях с образованием 1,2- и 1,3-диглицеридов или моноглицеридов. Молекулярная масса липазы молока примерно 7000 Да, оптимум pH 9,0–9,2 при гидролизе молочного жира [10].

В молоке содержится нативная и бактериальная липаза. Количество нативной липазы в нормальном молоке незначительно. Фермент связан главным образом с казеином и иммуноглобулинами (плазменная липаза), и лишь небольшая часть его (от 1 до 10%) адсорбирована оболочками шариков жира (мембранная липаза) [11]. При распределении липазы с белков на оболочки шариков жира в случае создания определенных условий наступает гидролиз жира, т. е. его разложение на глицерин и жирные кислоты, что приводит к прогорканию молока и молочных продуктов.

Липаза истинная (нативная) инактивируется при температуре 74–80 °С, бактериальная — при –85–90 °С. Нативная липаза теряет активность при температуре хранения молока от 0 до 5 °С через 48 ч, но при повышении титруемой кислотности молока и молочного жира ее активность возрастает [12]. Как правило, прогорклый вкус молока и молочных продуктов вызывает липаза, выделяемая посторонней микрофлорой молока — психротрофными микрококками.

Температурная обработка молока (охлаждение) способствует процессу липолиза, поскольку изменяет состав микрофлоры молока — начинают преобладать психротрофные бактерии, которые могут размножаться при низких температурах. Температурные режимы обработки молока при выработке сыров способствуют инак-

тивации нативной липазы, чего нельзя сказать о бактериальной липазе, отличающейся термостабильностью [13].

### Материалы исследований

Лабораторные исследования молока осуществлялись в лаборатории биохимических исследований ГНУ «Сибирский НИИ сыроделия Россельхозакадемии г. Барнаула».

Объектом исследования являлось сырое цельное коровье молоко, получаемое от постоянного поставщика. Также изучались образцы молока, полученные от коров, больных маститом.

Для исследования проводились отбор средних проб сырого молока в соответствии с требованиями государственных отраслевых стандартов и их подготовка к анализу, включающая предварительный подогрев молока до 40 °С, выдержку в течение 1 мин и охлаждение до 20 °С [14].

### Методы исследования

В анализируемых образцах молока контролировали активность липазы и изменение ее активности в течение часа при 38 °С.

В исследовании использовали количественный метод определения активности липазы, основанный на нейтрализации жирных кислот, выделившихся в процессе гидролиза, раствором едкого натра в присутствии фенолфталеина.

При проведении анализа в 6 стаканчиков объемом 50 см<sup>3</sup> или широкие пробирки наливали по 2 см<sup>3</sup> исследуемого молока и по 10 капель 5%-ного раствора панкреатина (или препарата липазы). В нашей работе была использована прегастральная телячья липаза, произведенная фирмой «Каглифисо Клеричи». В первый стаканчик (контроль) приливали 1 каплю 1%-ного раствора фенолфталеина и титровали 0,05 н раствором NaOH до появления розового окрашивания. Остальные стаканчики помещали в водяную баню или термостат при 38 °С. Каждые 10 мин вынимали по стаканчику, добавляли по 1 капле раствора фенолфталеина и титровали 0,05 н раствором NaOH до возникновения розового окрашивания такой же интенсивности, как у контроля.

Количество щелочи, пошедшее на титрование в каждом стаканчике, после предварительного вычитания количества щелочи, пошедшего на контрольное титрование, последовательно откладывали на оси ординат, а время выдержки в термостате (водяной бане) — по оси абсцисс. Получали кривую изменения активности липазы.

Активность липазы выражали в мг% NaOH, нейтрализующего выделившиеся в процессе гидролиза жирные кислоты.

$$X = 0,05 \cdot v \cdot 100 \cdot 0,97/2,$$

где 0,05 — нормальность раствора NaOH; v — количество NaOH, пошедшее на титрование 2 см<sup>3</sup> молока, см<sup>3</sup>; 2 — количество молока, взятое для анализа, см<sup>3</sup>;

0,97 — коэффициент для пересчета количества молока из  $\text{см}^3$  в г [15].

Анализ качественных показателей молока производился на приборе «Милкоскан FT 120». Работа анализатора основана на инфракрасной Фурье-спектроскопии.

Количество соматических клеток в молоке определяли с помощью вискозиметра «Соматос-М» с использованием препарата «Мастоприм» 2,5% раствора [16].

### Результаты исследования

Анализируемые образцы молока были разделены на две группы в зависимости от содержания сомати-

ческих клеток: нормальное молоко и аномальное молоко (молоко с примесью маститного).

При лабораторном исследовании сырого молока были получены следующие данные активности липазы, представленные в таблице 1 и на рисунке 1.

Анализ данных показал, что активность липазы в молоке с примесью маститного выше и составляет  $2,83 \pm 0,12 \text{ мг}\% \text{ NaOH}$ . Помимо этого, мы оценили изменение активности липазы во всех образцах молока (табл. 2).

Таблица 1

Активность липазы сырого молока

| Проба             | Активность липазы, $\text{мг}\% \text{ NaOH}$ | Соматические клетки, тыс. кл/ $\text{см}^3$ |
|-------------------|---|---|
| Нормальное молоко | $2,51 \pm 0,14$                               | $452,33 \pm 1,28$                           |
| Аномальное молоко | $2,83 \pm 0,12$                               | $856,66 \pm 0,85$                           |

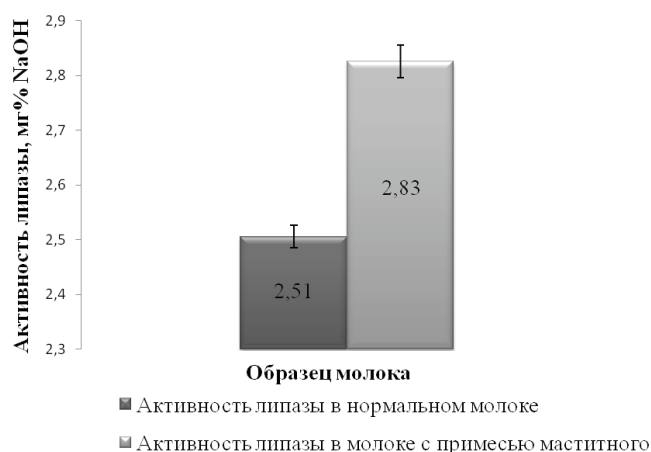


Рис. 1. Активность липазы в нормальном и аномальном молоке

Таблица 2

Изменение активности липазы сырого молока,  $\text{мл NaOH}$

| Проба             | Время, мин        |                   |                   |                   |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                   | 10                | 20                | 30                | 40                | 50                |
| Нормальное молоко | $0,080 \pm 0,001$ | $0,130 \pm 0,001$ | $0,200 \pm 0,003$ | $0,200 \pm 0,001$ | $0,230 \pm 0,002$ |
| Аномальное молоко | $0,100 \pm 0,003$ | $0,170 \pm 0,001$ | $0,230 \pm 0,004$ | $0,270 \pm 0,002$ | $0,300 \pm 0,003$ |

Активность липазы со временем постепенно возрастает при температуре  $38^\circ\text{C}$ , графики изменения активности липазы представляют собой линейную зависимость (рис. 2).

Усиление липолитической активности в аномальном молоке объясняется повышением уровня инфильтрации плазмы крови, значительным влиянием лейкоцитарной липазы, а также изменением состояния оболочек шариков жира. В результате происходит высвобождение липазы, связанной с микросомами

этих оболочек, и сближение ее с субстратом — молочным жиром.

При исследовании качественных показателей молока были получены следующие данные, представленные в таблице 3 и на рисунке 3.

Анализ данных показал, что в молоке с примесью маститного наблюдается снижение основных качественных показателей: белка, жира, казеина и лактозы.

Физико-химические показатели молока представлены в таблице 4.

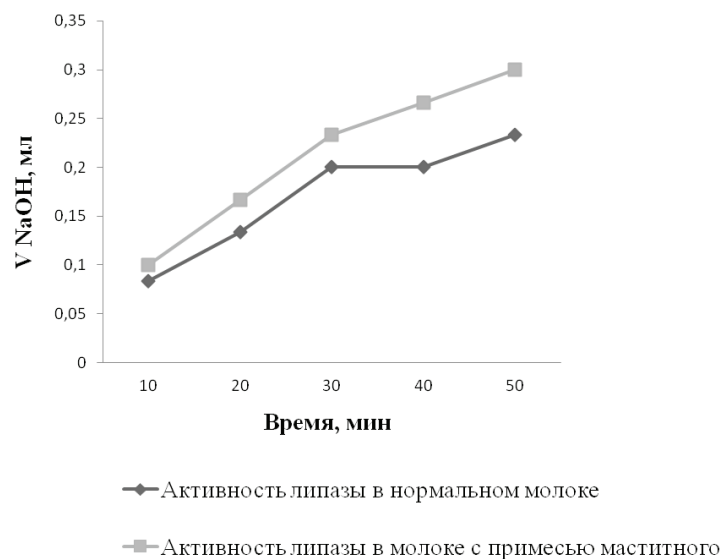


Рис. 2. Изменение активности липазы в нормальном и аномальном молоке

Таблица 3

Основные качественные показатели сырого молока

| Образец           | Казеин, %     | Белок, %      | Жир, %        | Сухие вещества, % | СОМО, %       | Лактоза, %    | Мочевина, мг%  | Соматические клетки, тыс. кл/см <sup>3</sup> |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|---------------|---------------|----------------|--|
| Нормальное молоко | 2,61<br>±0,24 | 3,38<br>±0,24 | 4,50<br>±0,12 | 13,15<br>±0,18    | 8,69<br>±0,07 | 4,45<br>±0,05 | 21,43<br>±0,18 | 452,33<br>±1,28                              |
| Аномальное молоко | 2,44<br>±0,10 | 3,21<br>±0,15 | 4,39<br>±0,43 | 13,11<br>±0,23    | 8,36<br>±0,08 | 4,33<br>±0,08 | 20,32<br>±0,12 | 856,66<br>±0,85                              |

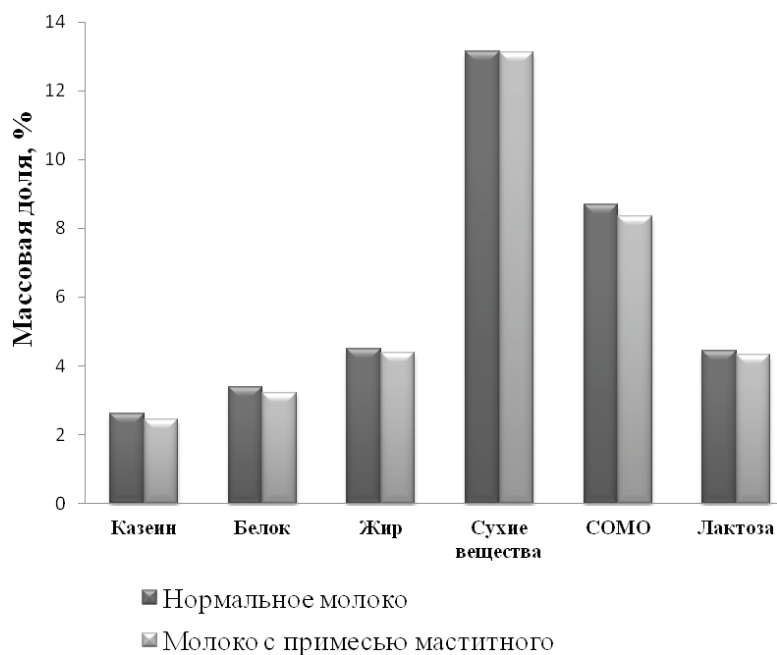


Рис. 3. Основные показатели нормального и аномального молока

Таблица 4

## Физико-химические показатели молока

| Образец           | Основные показатели молока  |                              |                 |
|-------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------|
|                   | Температура заморозания, °C | Плотность, кг/м <sup>3</sup> | Кислотность, °T |
| Нормальное молоко | — 0,540±0,01                | 1028,31±0,16                 | 16,03±0,09      |
| Аномальное молоко | — 0,550±0,01                | 1027,11±0,12                 | 16,52±0,07      |

Точка заморозания и плотность у молока с примесью маститного ниже, но данные физико-химические показатели входят в пределы нормы. Кислотность молока с примесью маститного выше и составляет 16,52±0,07 °T.

Чтобы выявить возможную взаимосвязь между активностью липазы и изменением качественных показателей сырого молока, а также между количеством соматических клеток и изменением активности липазы, был проведен корреляционный анализ. Установлена сильная положительная связь между активностью липазы и кислотностью молока (коэффициент корреляции — 0,62) и сильная отрицательная связь между активностью липазы и изменением массовой доли жира (коэффициент корреляции — 0,73). Определена сильная положительная взаимосвязь между количеством соматических клеток и активностью липазы в сыром молоке. Коэффициент корреляции составил 0,84.

Усиление липолитической активности в молоке приводит к интенсивному гидролизу жировых шариков

и накоплению свободных жирных кислот. Такое молоко отличается не только пороками вкуса и запаха, но и непригодностью для дальнейшего использования в производстве молочных продуктов. В сыром молоке есть нативная липаза, поэтому при получении и первичной обработке на такое молоко оказывают минимальное механическое воздействие, чтобы не допустить разрушения оболочек жировых шариков и активирования липазы. Помимо этого, бактериальная липаза, содержащаяся в маститном молоке, является термоустойчивой и даже после пастеризации сохраняет свою активность и предрасположенность молока к окислению молочного жира.

Все это снижает биологическую ценность молока, ухудшает его органолептические показатели и изменяет технологическую пригодность: снижает термоустойчивость, увеличивает продолжительность сквашивания при производстве кисломолочных продуктов и уменьшает выход белковых молочных продуктов [17].

## Библиографический список

1. Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. — СПб., 2001.
2. Горбатова К. К. Химия и физика молока. — СПб., 2004.
3. Дуденков А. Я., Дуденков Ю. А. Биохимия молока и молочных продуктов. — М., 1972.
4. Шидловская В. П. Ферменты сырого молока и их роль в оценке его качества // Молочная промышленность. — М., 2009. — № 1.
5. Родионов Г. В., Ермошина Е. В., Поставнева Е. В. Влияние различных факторов на количество соматических клеток в молоке коров // Молочная промышленность. — М., 2011. — № 6.
6. Технический регламент на молоко и молочную продукцию : Федеральный закон № 88-ФЗ. — 2008.
7. СанПиН 2.3.2.1078-01-1.2.1.1. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. — 2001.
8. Hand K. J., Godkin M. A., Kelton D. F. Bulk milk somatic cell penalties in herds enrolled in Dairy Herd Improvement programs // Journal Dairy Sciens. — 2012. — Vol. 95.
9. Шидловская В. П. Влияние соматических клеток на ферментный спектр сырого коровьего молока // Молочная промышленность. — М., 2009. — № 4.
10. Вистовская В. П. Гидролитические ферменты в биотехнологии сыра // Известия Алтайского государственного университета. — 2012. — № 3/2.
11. Нечаев А. П., Траубенберг С. Е., Кочеткова А. А. Пищевая химия. — СПб., 2007.
12. Келли А. Л., Фокс П. Ф. Нативные ферменты молока // Молочная промышленность. — М., 2007. — № 6.
13. Шидловская В. П., Юрова Е. А. Антиоксиданты молока и их роль в оценке его качества // Молочная промышленность. — М., 2010. — № 2.
14. Крусь Г. Н., Шалыгина А. М., Волокитина З. В. Методы исследования молока и молочных продуктов. — М., 2000.
15. Инихов Г. С., Брио Н. П. Методы анализа молока и молочных продуктов. — М., 1971.
16. Охрименко О. В., Горбатова К. К., Охрименко А. В. Лабораторный практикум по химии и физике молока. — СПб., 2005.
17. Сивкин Н. В., Стрекозов Н. И. Оценка количества соматических клеток в молоке коров в период лактации // Молочная промышленность. — М., 2010. — № 11.