

СПЕКТРЫ КАРБОНИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕЛКОВ КОРОВЬЕГО МОЛОКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ПАСТЕРИЗАЦИИ

М.А. Соколова¹, С.А. Коновалов¹, В.Е. Высокогорский¹, Н.А. Беланова², К.К. Полянский³

¹ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

³ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова»

Поступила в редакцию 24.03.2025 г.

Аннотация. Повышенная температура, используемая при пастеризации, и ряд других технологических факторов, вызывают снижение активности ферментов, а также уровня антиоксидантов. Определение окислительного повреждения белков пищевых продуктов важно для оценки биологической и пищевой ценности продукта питания. Окислительная модификация белков может вызвать разрушение незаменимых аминокислот, повлиять на процессы переваривания белков, привести к образованию токсичных соединений, что определяет важность поиска чувствительных и специфичных маркеров структурных нарушений белков в продуктах питания.

Объектами исследования служили образцы молока продукции молокоперерабатывающего предприятия «Манрос-М» (Омский филиал АО «Вимм-Билль-Данн»), полученные при различных режимах пастеризации.

В качестве критерия окислительной деструкции белков молока в работе использовано определение уровня карбонильных производных по реакции 2,4-динитрофенилгидразина и аминокислотных остатков с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона (Reznick A.Z., Parker L.) с регистрацией продуктов их превращения на спектрофотометре UNICO 2800 (США) при длинах волн от 230 до 535 нм. Для оценки максимально возможного уровня окислительной модификации исследуемого материала определяли уровень карбонильных производных после индукции окисления *in vitro* (по реакции Фентона: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 и ЭДТА).

В результате проведенных исследований установлено увеличение в условиях спонтанного окисления АДНФГ (альдегид-динитрофенилгидразонов) пастеризованного молока в 3,2 раза, а ультрапастеризованного молока в 3,6 раза. В такой же степени повышается содержание КДНФГ (кетон-динитрофенилгидразонов) пастеризованного молока в 3,5 раза и ультрапастеризованного молока в 3,4 раза. При одновременном определении содержания карбонильных соединений в микрофильтрованном продукте, который подвергался низкотемпературной пастеризации (при 65 °С) не обнаружено существенных отличий от данных молока-сырья. Показатели металл-катализируемого окисления белков пастеризованного и ультрапастеризованного молока не отличаются от данных молока-сырья.

Таким образом, воздействие высокой температуры при пастеризации и ультрапастеризации вызывает значительное увеличение интенсивности окислительной модификации белков молока, проявляющееся в повышении уровня карбонильных соединений.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, карбонильные производные, пастеризация молока, ультрапастеризованное молоко, температурное воздействие

Воздействие повышенной температуры на молочные продукты – необходимое условие для уменьшения бактериальной обсемененности молока. Однако пастеризация вызывает снижение активности ряда ферментов антиоксидантной системы [1] и, прежде всего, каталазы [2]. Повышенная

температура вызывает не только снижение активности ферментов, но и неферментных компонентов антиоксидантной защиты, в частности, разрушение некоторых полифенолов [1]. Снижение антиоксидантной активности сопровождается активацией свободно-радикального окисления липидов с повышением уровня продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) более чем на 30% [2] и увеличением показателей хемилюминесценции молока [3, 4].

© Соколова М.А., Коновалов С.А., Высокогорский В.Е., Беланова Н.А., Полянский К.К., 2025

Однако при различных режимах пастеризации молока обнаружено увеличение интегральной антиоксидантной активности [5-6], что авторы объясняют высвобождением антиоксидантов из жировых шариков и увеличением свободных сульфгидрильных групп, образующихся в результате разрыва дисульфидных связей между полипептидными цепями при денатурации белка. Несмотря на некоторое увеличение антиоксидантной активности повышение температуры свыше 65°C вызывает существенные изменения полипептидного состава молока. Пастеризация, по данным Балакиревой Ю.В. с соавт. [5-6], приводит к снижению уровня высокомолекулярных полипептидов и увеличению низкомолекулярных, что указывает на значительную деструкцию белков молока [7]. При термической обработке молока происходит не только увеличение низкомолекулярных полипептидов, но и взаимодействие белков сыворотки с мицеллами казеина и агрегация/диссоциация мицелл казеина [8]. Изменение спектра полипептидов свидетельствует о значительной деструкции белкового состава, однако необходимы более чувствительные критерии выявления белковых повреждений. Самыми распространенными, первичными нарушениями являются окислительные реакции. Так, достаточно часто используется определение восстановленных форм тиолов после разрыва дисульфидных связей полипептидных цепей, образование тирозина и битирозина, радикалов триптофана, окисленных активными формами кислорода [9]. Однако эти тесты характеризуют обмен отдельных аминокислот, но окисление белка охватывает и образование карбонильных соединений из более широкого спектра аминокислот, что привело к возникновению термина «карбонилирование белка» как синонима процесса окисления белка [10]. Несмотря на структурное разнообразие продуктов окисления белка наиболее широко используемым методом как для тканей животных, так и для пищевых продуктов является определение карбонильных групп, которые вступают в реакцию с 2,4-динитрофенилгидразином (ДНФГ) с образованием гидразонов [11]. При определенных ограничениях использования данного критерия (невозможность применения метода для определения карбонильных групп в нерастворимых в воде белках, недостаточная специфичность) с помощью реакции с ДНФГ уровень карбонильных групп определен в соевом белке, мышечном белке курицы, свинины, говядины, молочных продуктах, детских молочных смесях и других пищевых продуктах [10, 12, 13].

Определение окислительного повреждения белков пищевых продуктов важно для оценки биологической и пищевой ценности продукта питания, так как образование карбонильных производных снижает уровень в белке эссенциальных аминокислот, влияет на усвояемость белков, может привести к образованию токсичных соединений [10, 13]. Показано, что содержание карбонильных соединений повышается при высокотемпературной пастеризации [14]. Однако в [14] приведены показатели уровня динитрофенилгидразонов только при длинах волн: 356, 370, 430 и 530 нм, что не позволяет определить соотношение альдегид-динитрофенилгидразонов (АДНФГ) и кетон-динитрофенилгидразонов (КДНФГ), маркеров первичных и вторичных окислительных повреждений белков и окислительно-резервный потенциал. В связи с чем необходимым является исследование спектральных характеристик карбонильных производных белков в более широком диапазоне длин волн.

Цель исследования: спектрофотометрическое определение уровня карбонильных производных белков в видимой и УФ-областях спектра после высокотемпературной и низкотемпературной пастеризации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили образцы молока продукции молокоперерабатывающего предприятия «Манрос-М» (Омский филиал АО «Вимм-Билль-Данн»), полученные при различных режимах пастеризации, молоко отборное «Домик в деревне» (пастеризация при 72-75°C в течение 15-20 сек.), молоко питьевое ультрапастеризованное для детского питания «Тема» (пастеризация при 125-130°C в течение 2-4 сек.) и молочный микрофильтрованный продукт – ретентат (пастеризация при 65°C).

Оценка окислительной модификации белка производилась по методу Reznick A.Z., Parker L. [15] в модификации Дубининой Е.Е. [16], основанному на реакции взаимодействия карбонильных производных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием производных 2,4-динитрофенилгидразона с регистрацией продуктов их превращения на спектрофотометре UNICO 2800 (США) в интервале длин волн 230÷535 нм.

В соответствии с результатами хроматографического анализа [17] при длинах волн 230, 254, 270, 280, 356 нм регистрируются альдегид-

динитрофенилгидразоны (АДНФГ) нейтрального характера, а при длине волны равной 363 нм и при 370 нм – кетон-динитрофенилгидразоны (КДНФГ) нейтрального характера. В области видимого света регистрируются АДНФГ (428 и 430 нм) и КДНФГ (434 нм) основного характера [17]. Для оценки максимально возможного уровня окислительной модификации исследуемого материала определяли уровень карбонильных производных после индукции окисления *in vitro* по реакции Фентона (добавление $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2O и ЭДТА). Результаты исследования сравнивали с показателями коровьего молока-сырья.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica 6.0. Использовали параметрический критерий Стьюдента, результаты представлены в виде средне арифметического значения ($M \pm m$). Критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез принимали $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют, что повышенная температура при пастеризации и ультрапастеризации не влияет существенно на уровень показателей АДНФГ нейтрального характера (табл. 1). Увеличение содержания карбонильных соединений на 82,9% в пастеризованном молоке и на 47,5% в ультрапастеризованном молоке выяв-

лено при регистрации оптической плотности при длине волны 356 нм. Путем измерения оптической плотности при длинах волн 363 и 370 нм установлено соответственно, что показатели КДНФГ нейтрального характера увеличены как для пастеризованного молока на 77,9 и 129,2%, так и для ультрапастеризованного молока – на 54,1 и 97,5%.

Увеличение содержания карбонильных соединений в условиях спонтанного окисления детектируется в большей степени в видимой области спектра. Показано, что в 3,2 раза увеличено содержание АДНФГ в пастеризованном молоке (при измерении оптической плотности при длине волны 428 нм), а для ультрапастеризованного молока – в 3,6 раза. В такой же степени (в 3,5 раза) повышается содержание КДНФГ пастеризованного и ультрапастеризованного молока, определяемое при 430 нм и 434 нм. При одновременном определении содержания карбонильных соединений в микрофильтрованном продукте, который подвергался низкотемпературной пастеризации (при 65 °С) не обнаружено существенных отличий от данных молока-сырья.

Стимулирование образования свободных радикалов по реакции Фентона (добавление пероксида водорода с ионами железа) вызывало значительную активацию (в 15-20 раз) образования карбонильных производных белков как в молоко-сырье, так в пастеризованном и ультрапастеризованном молоке и в несколько меньшей степени в

Таблица 1

Содержание карбонильных производных белков молока при спонтанной окислительной модификации (у.е./мг белка)

| Длина волны | Молоко коровье-сырье | Молоко пастеризованное | Молоко ультрапастеризованное | Молочный микрофильтрованный продукт |
|-------------|----------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| 254 | 167,3±85,5 | 173,4±33,1 $p>0,05$ | 136,9±35,2 $p>0,05$ | 140,9±38,5 $p>0,05$ |
| 270 | 157,5±64,5 | 185,4±13,3 $p>0,05$ | 202,8±38,8 $p>0,05$ | 261,3±49,6 $p>0,05$ |
| 280 | 177,7±58,5 | 148,1±11,4 $p>0,05$ | 127,2±17,6 $p>0,05$ | 234,8±43,3 $p>0,05$ |
| 356 | 64,2±6,1 | 117,4±16,3 $p<0,05$ | 94,7±12,4 $p<0,05$ | 69,4±7,6 $p>0,05$ |
| 363 | 62,1±6,5 | 110,4±10,4 $p<0,05$ | 95,6±11,3 $p<0,05$ | 63,2±9,8 $p>0,05$ |
| 370 | 50,5±5,62 | 115,7±10,4 $p<0,05$ | 99,7±10,8 $p<0,05$ | 58,4±10,7 $p>0,05$ |
| 428 | 19,2±3,3 | 62,1±7,4 $p<0,05$ | 68,8±10,9 $p<0,05$ | 27,3±7,9 $p>0,05$ |
| 430 | 17,8±3,6 | 62,9±7,6 $p<0,05$ | 60,2±9,0 $p<0,05$ | 27,6±7,9 $p>0,05$ |
| 434 | 17,3±3,7 | 60,0±8,4 $p<0,05$ | 60,5±8,2 $p<0,05$ | 28,4±8,3 $p>0,05$ |

Примечание: Значения p в сравнении с данными коровьего молока-сырья. Статистически достоверные отличия отмечены жирным шрифтом.

микрофильтрованном молочном продукте. Показатели металл-катализируемого окисления белков пастеризованного и ультрапастеризованного молока не отличаются от данных молока-сырья (табл. 2). Показатели уровня карбонильных производных белков пастеризованного молока (по сравнению с исходным сырьем), определяемые путем измерения оптической плотности при длинах волн, соответствующих видимой области спектра и при 254 и 280 нм, ниже на 16,3 и 15,5 % соответственно, а для белков ультрапастеризованного молока – на 14,2 и 19,7% соответственно. Уровень карбонильных производных белков молочного микрофильтрованного продукта при металл-катализируемом окислении ниже на 33-34% при регистрации оптической плотности при всех длинах волн в ультрафиолетовой и на 23-24% при измерении в видимой областях спектра, за исключением данных при 363 и 370 нм.

Таким образом, воздействие высокой температуры при пастеризации и ультрапастеризации вызывает значительное увеличение интенсивности окислительной модификации белков молока, проявляющееся в повышении уровня карбонильных соединений, в основном, за счет АДНФГ и КДНФГ основного характера, регистрируемых в видимой области спектра. Уровень карбонильных соединений нейтрального характера, регистрируемый путем измерения оптической плотности в УФ-области спектра, существенно не отличался

от данных молока-сырья, за исключением значительно менее выраженных изменений показателей при 356, 363, 370 нм. Определение максимально возможного уровня окислительной модификации *in vitro* путем металл-индуцированного окисления позволило установить практически одинаковые значения деструкции белковых структур в пастеризованном и ультрапастеризованном молоке.

Увеличение уровня АДНФГ может указывать на фрагментацию белковых молекул, а рост количества кетонов характеризует агрегацию белков, что в итоге приводит к нарушению конформации белковых молекул [18].

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что определение карбонильных соединений может служить маркером окислительной деструкции белков молока при различных температурных воздействиях. Причем данные настоящего исследования свидетельствуют о важности определения при спонтанном окислении показателей АДНФГ и КДНФГ основного характера путем регистрации оптической плотности в видимой области спектра при длинах волн 428, 430 и 434 нм, а определение карбонильных производных при остальных длинах волн не имеет информативной значимости. Отсутствуют существенные различия и в интенсивности окислительной модификации при выявлении максимально возможного уровня окислительной модификации белков молока при металл-катализируемом окислении.

Таблица 2

Содержание карбонильных производных белков молока при металл-катализируемой окислительной модификации (у.е./мг белка)

| Длина волны | Молоко коровье-сырье | Молоко пастеризованное | Молоко ультрапастеризованное | Молочный продукт микрофильтрованный |
|-------------|----------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 254 | 3026,9±95,5 | 2535,5±141,4 p<0,05 | 2596,3±180,8 p<0,05 | 1989,9±130,5 p<0,05 |
| 270 | 2836,4±125,0 | 2531,1±207,0 p>0,05 | 2413,8±189,0 p>0,05 | 1874,3±181,6 p<0,05 |
| 280 | 2447,2±72,8 | 2067,3±120,4 p<0,05 | 1966,5±148,9 p<0,05 | 1643,3±137,7 p<0,05 |
| 356 | 2194,1±171,3 | 2632,8±245,7 p>0,05 | 2400,0±222,3 p>0,05 | 1697,1±139,7 p<0,05 |
| 363 | 2166,6±191,5 | 2545,6±221,0 p>0,05 | 2512,1±233,3 p>0,05 | 1704,9±182,8 p>0,05 |
| 370 | 2208,3±196,2 | 2550,7±181,9 p>0,05 | 2558,0±239,7 p>0,05 | 1726,0±184,4 p>0,05 |
| 428 | 1298,8±59,1 | 1466,2±110,9 p>0,05 | 1371,7±108,7 p>0,05 | 996,0±90,5 p<0,05 |
| 430 | 1274,8±56,2 | 1452,8±115,0 p>0,005 | 1216,8±120,5 p>0,05 | 964,5±94,3 p<0,05 |
| 434 | 1224,6±52,7 | 1414,4±115,6 p>0,05 | 1246,8±99,1 p>0,05 | 929,1±89,9 p<0,05 |

Примечание: Значения p в сравнении с данными коровьего молока-сырья. Статистически достоверные отличия отмечены жирным шрифтом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При воздействии повышенной температуры в условиях пастеризации и ультрапастеризации при спонтанном окислении выявлено существенное повышение уровня карбонильных соединений в молочных продуктах, о чем свидетельствует изменение оптической плотности анализируемых образцов в области $\lambda = 356\div 434$ нм. Низкотемпературная пастеризация при получении молочного продукта микрофильтрованного-ретентата не сопровождалась повышением уровня карбонильных соединений, данные интенсивности окислительной модификации не отличались от показателей молока-сырья. При металл-катализируемом окислении уровень карбонильных соединений белков молока после пастеризации и ультрапастеризации не отличался от данных молока-сырья, а показатели белков молочного продукта микрофильтрованного-ретентата даже несколько ниже.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шидловская В.П. Антиоксидантная активность ферментов / В.П. Шидловская, Е.А. Юрова // Молочная промышленность. 2011. – № 12. – С. 48-49.
2. Щербакова Ю.В. Влияние тепловой обработки на компоненты антиоксидантной системы молока и его интегральную антиоксидантную активность: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.01.04 / Ю.В. Щербакова. – Москва: ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 2011. – 21 с.
3. Высокогорский В.Е. Хемилюминесцентный анализ пастеризованного молока / В.Е. Высокогорский, Г.В. Игнатъева // Пищевая промышленность. – 2012. – № 10. – С. 34-36.
4. Высокогорский В.Е. Оценка антиокислительных свойств козьего и коровьего молока / В.Е. Высокогорский, П.В. Веселов // Вопросы питания. – 2010. – Т. 79. – № 1. – С. 56-58.
5. Балакирева Ю.В. Изменение антиоксидантной активности молока при пастеризации / Балакирева Ю.В., Ахмадуллина Ф.Ю., Лапин А.А., Каримова Ф.Г. // Молочная промышленность. – 2010. – №9. – С. 74.
6. Балакирева Ю.В. Влияние термодеструкции жировых шариков молочного сырья казеинового типа на его интегральную антиоксидантную активность / Ю.В. Балакирева., Н.И. Анисимова, А.Р. Мухитов, Ф.Ю. Ахмадуллина, Ф.Г. Каримова // Вестник Казанского технологического университета. – 2010. – №8. – С. 121-124.
7. Балакирева, Ю.В. Влияние режима пастеризации на полипептидный состав молока / Ю.В. Балакирева, С.Ю. Зайцев, Ф.Г. Каримова, А.Н. Акулов, Ф.Ю. Ахмадуллина // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана. – 2011. – Т. 207. – С. 60-66.
8. Influence of heat treatment and microfiltration on the milk proteins properties. / Verruck S., Sartor S., Marendia F.B., da Silva Barros E.L., Camelo-Silva C., Machado Canella H. M., Prudencio E.S. // Adv. Food. Technol. Nutr. Sci Open. J. – 2019. – Vol.5. Iss 2. – P. 54-66.
9. Fuentes-Lemus E. Oxidation of free, peptide and protein tryptophan residues mediated by AAPH-derived free radicals: role of alkoxyl and peroxy radicals / E. Fuentes-Lemus, E. Dorta, E. Escobar, A. Aspee, E. Pino, M. L. Abasq, H. Speisky, E. Silva, E. Lissi, M. J. Daviesf and C. Lopez-Alarcon // RSC Advances. – 2016. – Vol. 6. – P. 57948-57955.
10. Hellwig M. The chemistry of protein oxidation in food / M. Hellwig // Angewandte Chemie International Edition. – 2019 – Vol. 58, Iss. 47. – P.16742-16763.
11. Levine R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. Lenz, B. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman // Methods of Enzymology. – 1990. – 186. – P. 464-478.
12. Chen Z., Leinisch F., Greco I., Zhang W., Shu N., Chuang Ch. Y. et al. Characterisation and quantification of protein oxidative modifications and amino acid racemisation in powdered infant milk formula // Free Radic. Res. – 2019. – Vol. 53, No. 1. – P. 68-81.
13. Estévez M., Díaz-Velasco S., Martínez R. Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update // Amino Acids. – 2022. – Vol. 54. – P. 559-573.
14. Загоруля И.П. Окислительная модификация белков молока при пастеризации / И.П. Загоруля, В.Е. Высокогорский, О.Н. Лазарева, Г.В. Игнатъева // Молочная промышленность. – 2019. – №7. – С.28-29.
15. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay / A.Z. Reznick, L. Packer // Methods Enzymol. – 1994. – 233. – 357-363.
16. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е.Е. Дубинина, С.О. Бурмистров, Д.А. Ходов, И. Г. Поротов // Вопр. мед. Химии. – 1995. – Т. 41. №1. – С. 24-26.
17. Патент: RU 2524667 C1. Номер заявки: 2013102618/15. Способ комплексной оценки со-

держания продуктов окислительной модификации белков в тканях и биологических жидкостях заявл.: 21.01.2013 опубл.: 27.07.2014 / Фомина М.А., Абаленихина Ю.В., Фомина Н.В., Терентьев А.А.

18. Фомина М.А. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота // М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – С. 192.

19. Шахристова Е.В. Степовая Е.А., Иванов В.В., Носарева О.Л., Рязанцева Н.В., Новицкий

ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»

Соколова Мария Александровна, аспирант кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии

Коновалов Сергей Александрович, кандидат технических наук, доцент, зав. кафедрой продуктов питания и пищевой биотехнологии

E-mail: sa.konovalev@omgau.org

Высокогорский Валерий Евгеньевич, доктор медицинских наук, профессор кафедры продуктов питания и пищевой биотехнологии

E-mail: ve.vysokogorskiy@omgau.org

Воронежский государственный университет

Беланова Наталья Анатольевна, кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии

Воронежский филиал ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова»

Полянский Константин Константинович, доктор технических наук, профессор, кафедра управления социально-экономическими системами и бизнес процессами

В.В. Окислительная модификация белков и система глутатиона в адипоцитах при сахарном диабете // Бюллетень сибирской медицины. 2014. – Т. 13, № 3. – С. 84-90.

20. Kehm R., Baldensperger T., Raupbach J., Höhn A. Protein oxidation formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases // Redox Biol. 2021. Vol. 42. Article ID 101901.

Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin

Sokolova Maria A., postgraduate student of the Department of Food and Food Biotechnology

Konovalev Sergey A., PhD., associate professor, Head of the Department of Foodstuffs and Food Biotechnology

E-mail: sa.konovalev@omgau.org

Vysokogorskiy Valery E. PhD., DSci, Full Professor of the Department of Foodstuffs and Food Biotechnology

E-mail: ve.vysokogorskiy@omgau.org

Voronezh State University

Belanova Natalia A., PhD, Assistant professor of Analytical Chemistry Department of Chemistry Faculty

Voronezh branch of the Plekhanov Russian University of Economics, Voronezh

Polyansky Konstantin K., PhD., DSci., Full Professor, Management of Socio-Economic Systems and Business Processes department

CARBONYL DERIVATIVES SPECTRUM OF COW'S MILK PROTEINS UNDER VARIOUS PASTEURIZATION CONDITIONS

М.А. Sokolova¹, S.A. Konovalev¹, V.E. Vysokogorskiy¹, N.A. Belanova², K.K. Polyansky³

¹*Omsk State Agrarian University named after P.A. Stolypin, Omsk*

²*Voronezh State University*

³*Plekhanov Russian University of Economics*

Abstract. The elevated temperature used during pasteurization and a number of other technological factors cause a decrease in enzyme activity and disruption of oxidative processes. Determination of

oxidative damage to food proteins is important for assessing the biological and nutritional value of a food product. Oxidative modification of proteins can cause the destruction of essential amino acids, affect protein digestion processes, and lead to the formation of toxic compounds. This determines the importance of searching for sensitive and specific markers of structural disorders of food proteins.

The objects of the study were samples of milk produced by the milk processing plant Manros-M (Omsk branch of JSC Wimm-Bill-Dann), obtained under various pasteurization conditions.

As a criterion for oxidative destruction of milk proteins, the paper used the determination of the level of carbonyl derivatives by the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine and amino acid residues with the formation of 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives (Reznick A.Z., Parker L.) with the registration of their transformation products on a UNICO 2800 spectrophotometer (USA) at wavelengths from 230 to 535 nm. To assess the maximum possible level of oxidative modification of the material under study, the level of carbonyl derivatives was determined after induction of oxidation in vitro by adding reagents for the Fenton reaction: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 and EDTA.

As a result of the conducted studies, an increase in the spontaneous oxidation of aldehyde-dinitrophenylhydrazone of pasteurized milk by 3.2 times, and of ultra-pasteurized milk by 3.6 times was established. The content of ketone-dinitrophenylhydrazone in pasteurized milk increases to the same extent by 3.5 times and in ultra-pasteurized milk by 3.4 times. When simultaneously determining the content of carbonyl compounds in a microfiltered product that was subjected to low-temperature pasteurization (at 65 °C), no significant differences from the data for raw milk were found. The indices of metal-catalyzed oxidation of proteins in pasteurized and ultra-pasteurized milk do not differ from those of raw milk.

Thus, exposure to high temperatures during pasteurization and ultra-pasteurization causes a significant increase in the intensity of oxidative modification of milk proteins, manifested in an increase in the level of carbonyl compounds.

Keywords: oxidative modification of proteins, carbonyl derivatives, milk pasteurization, ultra-pasteurized milk, temperature effects

REFERENCES

1. Shidlovskaya V.P. Antioksidantnaya aktivnost' fermentov / V.P. Shidlovskaya, E.A. Yurova // *Molochnaya promyshlennost'*. – 2011. – № 12. – P. 48-49.
2. Shcherbakova Yu.V. Vliyanie teplovoi obrabotki na komponenty antioksidantnoi sistemy moloka i ego integral'nuyu antioksidantnuyu aktivnost': avtoref. diss. ... kand. biol. nauk: 03.01.04 / Yu.V. Shcherbakova. – Moskva: FGBOU VPO MGAVMiB, 2011. – 21 p.
3. Vysokogorskii V.E. Khemilyuminentsentnyi analiz pasterizovannogo moloka / V.E. Vysokogorskii, G.V. Ignat'eva // *Pishchevaya promyshlennost'*. – 2012. – № 10. – P. 34-36.
4. Vysokogorskii V.E. Otsenka antiokislitel'nykh svoistv koz'ego i korov'ego moloka / V.E. Vysokogorskii, P.V. Veselov // *Voprosy pitaniya*. – 2010. – T. 79. – № 1. – P. 56-58.
5. Balakireva Yu.V. Izmenenie antioksidantnoi aktivnosti moloka pri pasterizatsii / Balakireva Yu.V., Akhmadullina F.Yu., Lapin A.A., Karimova F.G. // *Molochnaya promyshlennost'*. – 2010. – № 9. – P. 74.
6. Balakireva Yu.V. Vliyanie termodestruktsii zhirovykh sharikov molochnogo syr'ya kazeinovogo tipa na ego integral'nuyu antioksidantnuyu aktivnost' / Yu.V. Balakireva., N.I. Anisimova, A.R. Mukhitov, F.Yu. Akhmadullina, F.G. Karimova // *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*. – 2010. – № 8. – P. 121-124.
7. Balakireva, Yu.V. Vliyanie rezhima pasterizatsii na polipeptidnyi sostav moloka / Yu.V. Balakireva, S.Yu. Zaitsev, F.G. Karimova, A.N. Akulov, F.Yu. Akhmadullina // *Uchenye zapiski Kazanskoi gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny imeni N.E. Baumana*. – 2011. – T. 207. – P. 60-66.
8. Verruck S, Sartor S, Marenda F.B. [et al.] Influence of heat treatment and microfiltration on the milk proteins properties / Verruck S., Sartor S., Marenda F.B., da Silva Barros E.L., Camelo-Silva C., Machado Canella H. M., Prudencio E.S. // *Adv. Food. Technol. Nutr. Sci. Open. J.* – 2019. – Vol. 5. Iss 2. – P. 54-66.
9. Fuentes-Lemus E. Oxidation of free, peptide and protein tryptophan residues mediated by AAPH-derived free radicals: role of alkoxyl and peroxy radicals / E. Fuentes-Lemus, E. Dorta, E. Escobar, A. Aspee, E. Pino, M. L. Abasq, H. Speisky, E. Silva, E. Lissi, M. J. Davies and C. Lopez-Alarcon // *RSC Advances*. – 2016. – Vol. 6. – P. 57948-57955.
10. Hellwig M. The chemistry of protein oxidation in food / M. Hellwig // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2019 – Vol. 58, Iss. 47. – P. 16742-16763.
11. Levine R.L. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins / R.L. Levine, D.

- Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. Lenz, B. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman // *Methods of Enzymology*. – 1990. – 186. – P. 464-478.
12. Chen Z., Leinisch F., Greco I., Zhang W., Shu N., Chuang Ch. Y. et al. Characterisation and quantification of protein oxidative modifications and amino acid racemisation in powdered infant milk formula // *Free Radic. Res.* – 2019. – Vol. 53, No. 1. – P. 68-81.
13. Estévez M., Díaz-Velasco S., Martínez R. Protein carbonylation in food and nutrition: a concise update // *Amino Acids*. – 2022. – Vol. 54. – R. 559-573.
14. Zagorulya I.P. Okislitel'naya modifikatsiya belkov moloka pri pasterizatsii / I.P. Zagorulya, V.E. Vysokogorskii, O.N. Lazareva, G.V. Ignat'eva // *Molochnaya promyshlennost'*. – 2019. – №7. – S.28-29.
15. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay / A.Z. Reznick, L. Packer // *Methods Enzymol.* – 1994. – 233. – P. 357-363.
16. Dubinina E.E. Okislitel'naya modifikatsiya belkov syvorotki krovi cheloveka, metod ee opredeleniya / E.E. Dubinina, C.O. Burmistrov, D.A. Khodov, I. G. Porotov // *Vopr. med. Khimii*. – 1995. – T. 41. №1. – P. 24-26.
17. Patent: RU 2524667 C1. Nomer zayavki: 2013102618/15. Sposob kompleksnoi otsenki sodержaniya produktov okislitel'noi modifikatsii belkov v tkanyakh i biologicheskikh zhidkostyakh zayavl.: 21.01.2013 opubl.: 27.07.2014 / Fomina M.A., Abalenikhina Yu.V., Fomina N.V., Terent'ev A.A.
18. Fomina M.A. Okislitel'naya modifikatsiya belkov tkanei pri izmenenii sinteza oksida azota // M.A. Fomina, Yu.V. Abalenikhina. – Moskva: GEOTAR-Media, 2018. – P. 192.
19. Shakhristova E.V. Stepovaya E.A., Ivanov V.V., Nosareva O.L., Ryazantseva N.V., Novitskii V.V. Okislitel'naya modifikatsiya belkov i sistema glutationa v adipotsitakh pri sakharnom diabete // *Byulleten' sibirskoi meditsiny*. 2014. – T. 13, № 3. – P. 84-90.
20. Kehm R., Baldensperger T., Raupbach J., Höhn A. Protein oxidation formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases // *Redox Biol.* – 2021. – Vol. 42. – Article ID 101901.