

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА МОЛОЧНОГО САХАРА ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБАМИ

С.В. Мяло, Н.Б. Гаврилова, Т.Д. Воронова
Омский государственный аграрный университет, г. Омск
М.П. Щетинин

Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, г. Барнаул

В период проведения социально-экономических реформ и преобразований проблема правильного питания крайне обострилась. С этой точки зрения совершенствование технологии и ассортимента молочных продуктов с целью повышения их биологической ценности и придания им лечебно-профилактических свойств является важнейшей задачей молочной промышленности. Потребность регулярного употребления таких продуктов значительно возрастает в группе людей страдающих различными заболеваниями обмена веществ (диабет, атеросклероз, ожирение), сердечно-сосудистой системы, находящихся в экстремальных условиях, людей преклонного возраста и др.

Молоко из-за содержания в сбалансированном состоянии необходимых для организма человека питательных веществ (белки, углеводы, жиры) занимает особое место в рационе питания населения. Однако употребление его становится невозможным или беспоблезным, когда в организме человека нет биологического продуцирования фермента β -галактозидазы (лактазы) расщепляющего лактозу. В результате возникает лактазная недостаточность, которой по оценкам специалистов страдает более 70 % процентов населения в мире [5]. С возрастом, а также в результате заболевания поджелудочной железы [1] выработка β -галактозидазы снижается и человек испытывает дискомфорт после потребления молока и молочных продуктов. Решить данную проблему возможно путем создания низколактозных молочных продуктов. На западе низколактозные продукты занимают достойное место среди других лечебно-профилактических молочных продуктов. Среди них можно отметить продукты под марками «Lact-Aid» (США), Snow Brend Milk Product Co. Ltd (Япония), «Lactalac» (Голландия), NYLA (Финляндия) и др, содержание лактозы в которых снижено на 75 % и более [5, 4]. В нашей стране, к со-

жалению, ассортимент низколактозных молочных продуктов представлен недостаточно широко, в связи с этим необходимо проведение научных изысканий по разработке технологий низколактозных продуктов.

Одним из способов производства молочных продуктов с низким содержанием лактозы, является введение в молочные основы фермента β -галактозидазы. Данный фермент бывает различной природы. В молочной промышленности используют в основном β -галактозидазы дрожжевого и грибкового происхождения. Они отличаются друг от друга по физико-химическим и каталитическим свойствам. Препараты β -галактозидаз грибкового происхождения имеют более высокие термостабильность и температурные оптимумы от 30 до 50 °С чем ферменты из дрожжей от 30 до 35 °С. β -галактозидазы грибкового происхождения более устойчивы к изменениям рН среды, чем дрожжевые. Ферменты из грибов сохраняют 80 % активности при рН 2,8 или 5,4, дрожжевые ферменты более лабильны, при данных значениях рН их активность резко снижается. Оптимальный рН действия для грибных β -галактозидаз – от 4 до 6, для дрожжевых – от 6 до 7,2 [3]. Исходя из этих данных, следует отметить, что для практического применения грибные препараты β -галактозидазы представляют наибольший интерес.

Авторами поставлена цель, исследовать процесс гидролиза лактозы в молочных основах под воздействием β -галактозидазы грибкового происхождения из *Aspergillus niger* и молочнокислыми бактериями рода *Lactobacterium*. Лабораторные исследования проводили на кафедрах биохимии, технологии молока и молочных продуктов Омского государственного аграрного университета.

Для реализации цели исследования использовались следующие объекты и методы:

- молочное сырье - цельное молоко, обезжиренное молоко, сыворотка творожная;
- фермент β-галактозидаза из *Aspergillus niger* производитель Nature's Way (Регистрационное удостоверение Минздрава РФ №003136.И.840.08.2001) с активностью 3450 ед/г;
- закваска *Lactobacterium acidophilum* производитель СФ ВНИМИ (ТУ 10-02-02-789-65-91 закваски бактериальные, дрожжи и тест-культуры);
- закваска *Lactobacterium bulgaricum* производитель СФ ВНИМИ (ТУ 10-02-02-789-65-91 закваски бактериальные, дрожжи и тест-культуры)
- титруемая кислотность - по ГОСТ 3624-92;
- массовая доля жира - по ГОСТ 5867-90;
- массовая доля влаги и сухих веществ - по ГОСТ 3626-73;
- плотность – по ГОСТ 3625-84;
- массовая доля лактозы - йодометрическим и термисторным криоскопическим методами;

Работа осуществлялась последовательно. В первой серии экспериментов на лактозу воздействовали ферментным препаратом β-галактозидазы грибкового происхождения выделенного из *Aspergillus niger*. В качестве субстрата ферментации использовали молоко цельное, обезжиренное и сыворотку творожную. Характеристика молочного сырья приведена в таблице 1.

Для проведения опытов молочное сырье пастеризовали при (85±5) °С, охлаждали до исследуемой температуры ферментации, вносили предварительно растворенный в небольшом объеме соответствующей молочной основы фермент, тщательно перемешивали и помещали в термостат. Степень гидролиза определяли по изменению температуры замерзания молочного сырья через каждый час в течение 6 ч. Опыты проводили в 3...5 кратной повторностях.

Действие β-галактозидазы зависит от ряда факторов, важными из которых являются: температура, дозировка ферментного препарата и рН среды, при которой протекает процесс гидролиза, и его продолжительность.

Исследовали;

1. Влияние температуры на степень гидролиза лактозы в различных молочных средах при постоянной дозе фермента 150 ед/г лактозы. Температурные режимы (40±1) °С, (45±1) °С, (50±1) °С, продолжительность гидролиза – 1 ч.
2. Влияние продолжительности процесса на степень гидролиза лактозы в различных молочных средах при постоянной дозе фермента 150 ед/г лактозы и температуре процесса (45±1) °С.
3. Влияние дозировки ферментного препарата на степень гидролиза лактозы в различных молочных средах при постоянной температуре (45±1) °С. Исследуемые дозы ферментного препарата: 75, 150, 300, 450 ед/г лактозы, продолжительность гидролиза – 1 ч.

Обсуждение результатов исследования.

На рисунке 1 представлена зависимость степени гидролиза лактозы в молочных средах от температуры гидролиза. Результаты исследования были обработаны статистически с расчетом величины достоверности аппроксимации R^2 . Уравнения, показывающие зависимость степени гидролиза лактозы от температуры представлены в таблице 2.

Анализ экспериментальных данных подтверждает, что с повышением температуры гидролиза степень его возрастает. В творожной сыворотке зависимость степени гидролиза от температуры выражается логарифмической зависимостью, в обезжиренном и цельном молоке степенной зависимостью с достаточно высокой достоверностью аппроксимации.

Таблица 1 – Физико-химические показатели молочного сырья

Молочное сырье	Физико-химические показатели				
	Титруемая кислотность, °Т	Активная кислотность, рН	Массовая доля лактозы, %	Массовая доля жира, %	Плотность г/см ³
Цельное молоко	18-20	6,4	4,69-4,73	2,5	1,0269
Обезжиренное молоко	16-18	6,5	4,5-4,56	0,05	1,0325
Сыворотка творожная	60-69	4,8	4,15-4,21	0,05	1,0225

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА МОЛОЧНОГО САХАРА ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБАМИ

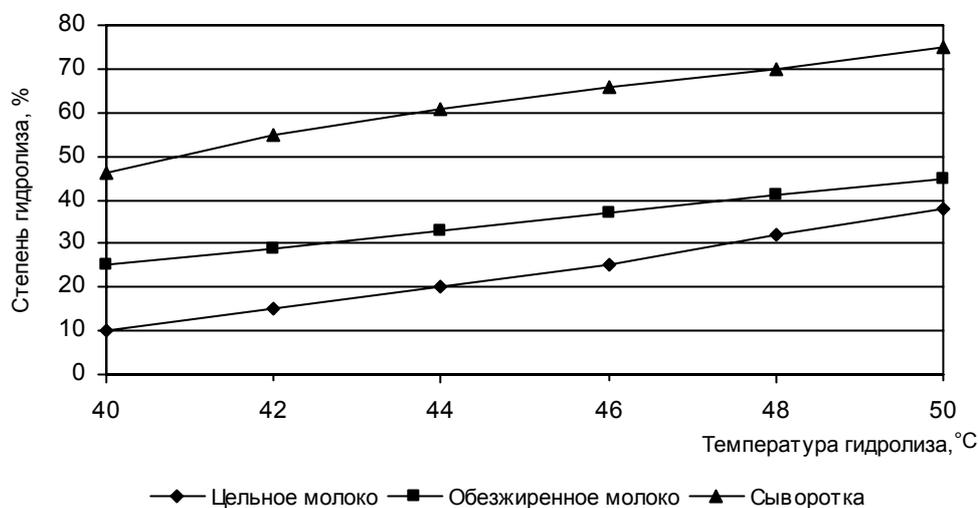


Рисунок 1 – Влияние температуры на степень гидролиза в молочных средах

Таблица 2 – Зависимость степени гидролиза от температуры

Исследуемые варианты	Уравнение регрессии	Ограничение	R ²
Цельное молоко	$y=6e-11x^{7,017}$	$0 \leq X \leq 5$	0,9979
Обезжиренное молоко	$y=2e-05x^{3,7718}$	$0 \leq X \leq 5$	0,98
Сыворотка	$y=130,4 \ln(x)-432,07$	$0 \leq X \leq 5$	0,9972

Из данных представленных на рисунке 1 видно, что в интервале температур от $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ до $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ процент гидролиза во всех молочных средах монотонно возрастал. Наибольшую активность фермент проявил при температуре 50°C . Однако степень гидролиза во всех молочных средах неоднозначна. Наиболее близки по показателям степени гидролиза друг к другу цельное и обезжиренное молоко. В интервале температур от $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ до $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ наблюдается практически линейная зависимость, с дальнейшим повышением температуры до $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$, эта зависимость превращается в степенную. Это говорит о том, что при $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ в цельном и обезжиренном молоке наблюдается максимальное насыщение продуктами гидролиза. В цельном молоке гидролиз идет в 1,5-2 раза менее активно, чем в обезжиренном молоке. Вероятно, благодаря более низкой вязкости обезжиренного молока распределение фермента в пространстве объекта выражено лучше, чем в цельном, а также наличие в цельном молоке компонентов молочного жира (фосфолипиды и др.) тоже может

быть причиной более низкой степени гидролиза. В творожной сыворотке зависимость степени гидролиза от температуры в интервале от $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ до $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ выражено линейно, с дальнейшим повышением температуры до $(50 \pm 1)^\circ\text{C}$ эта зависимость переходит в логарифмическую. Степень гидролиза в сыворотке наиболее выражена, чем в цельном и обезжиренном молоке, это связано с pH-средой. Активная кислотность сыворотки составляет от 4,5 до 4,8, что является оптимумом действия β -галактозидаз грибного происхождения.

Данные исследования влияния продолжительности процесса на степень гидролиза лактозы в молочных средах статистически обработаны с расчетом величины достоверности аппроксимации R^2 и графически представлены на рисунке 2. Уравнения, описывающие зависимость степени гидролиза от дозы фермента в различных молочных средах представлены в таблице 3.

Анализ полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что в молочных

средах степень гидролиза с течением времени монотонно возрастает. В первые часы гидролиза наблюдается максимальная ско-

рость распада лактозы, в дальнейшем происходит некоторое затухание процесса. Скорее

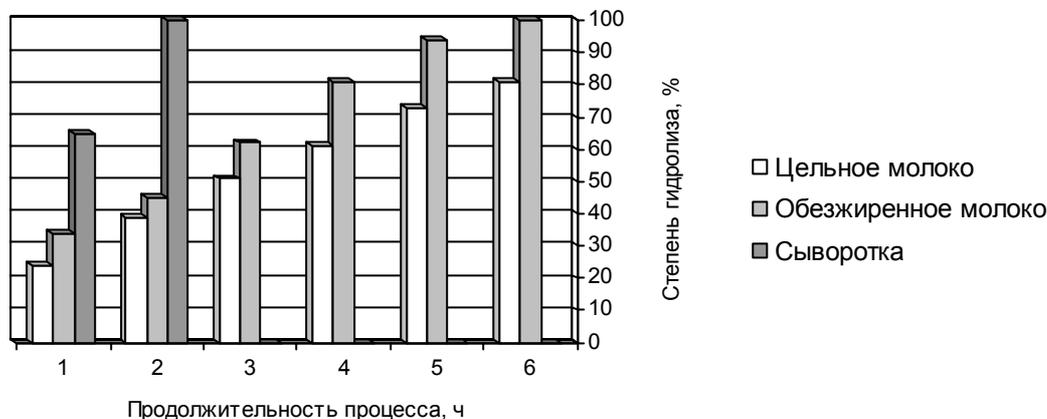


Рисунок 2 – Влияние продолжительности процесса на степень гидролиза в молочных средах

Таблица 3 – Зависимость степени гидролиза от продолжительности процесса

Исследуемые варианты	Уравнение регрессии	Ограничение	R ²
Цельное молоко	$y=11,357 \ln(x)+0,5165$	$0 \leq X \leq 5$	0,9994
Обезжиренное молоко	$y=51,088 \ln(x)-3,4757$	$0 \leq X \leq 5$	0,98
Сыворотка	$y=41,61 \ln(x)-3,547$	$0 \leq X \leq 5$	0,9876

всего, это связано со снижением концентрации лактозы и соответствующим увеличением продуктов распада (глюкоза и галактоза), которые несколько мешают дальнейшему процессу гидролиза с такой же эффективностью. Имеются данные что фермент β-галактозидаза высокоспецифичен к остатку β-галактозы [2] и с увеличением последнего активность фермента снижается.

В молочных средах степень гидролиза выражена по-разному. Наиболее продолжителен процесс в цельном молоке, за 6 часов произошло 80 % процентов гидролиза лактозы, когда в обезжиренном молоке лактоза к этому времени была полностью гидролизована. Наименьшее время на распад лактозы ферменту понадобилось в сыворотке, за два часа лактоза в сыворотке была гидролизована на 100 %.

Результаты исследования влияния дозы фермента на степень гидролиза лактозы, статистически обработаны (с расчетом величины достоверности аппроксимации R²) и

представлены на рисунке 3. Уравнения, описывающие зависимость степени гидролиза от дозы фермента в различных молочных средах представлены в таблице 4.

Анализ обработанных данных эксперимента свидетельствует о том, что с повышением дозы фермента степень гидролиза в молочных средах возрастает с логарифмической зависимостью. Увеличение дозы от 75 до 150 ед/г скорость гидролиза возрастает линейно, с дальнейшим повышением дозы ферментного препарата до 300-450 ед/г эта зависимость переходит в логарифмическую. То есть с увеличением дозы фермента от 75 до 150 ед/г степень гидролиза возрастает в 1,5-1,7 раза, дальнейшее повышение концентрации ферментного увеличивает степень гидролиза в 1,2 раза. Во всех молочных средах повышение дозы фермента приводит к увеличению степени гидролиза неодинаково. В обезжиренном и цельном молоке с повышением дозы фермента от 75 до 150 ед/г разница по степени гидролиза со-

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА МОЛОЧНОГО САХАРА ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБАМИ

ставляет в среднем 6,5 %, с дальнейшим повышением дозы до 300-450 ед/г разница составляет от 3 до 4 %, то есть с увеличением

концентрации фермента отличие по степени гидролиза лактозы в цельном молоке и обезжиренном становится менее выраженным.

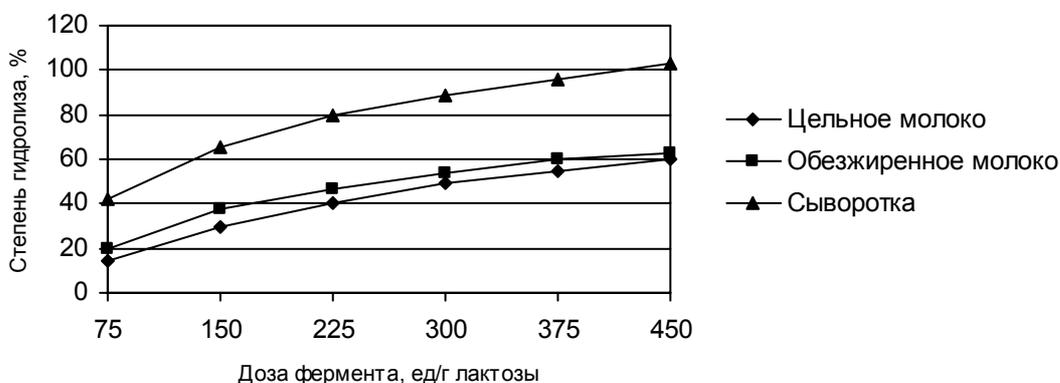


Рисунок 3 – Влияние дозы фермента на степень гидролиза в молочных средах

Таблица 4 – Зависимость степени гидролиза от дозы фермента

Исследуемые варианты	Уравнение регрессии	Ограничение	R ²
Цельное молоко Обезжиренное молоко Сыворотка	$y=26,799 \ln(x)-104,21$	$0 \leq X \leq 5$	0,97
	$y=23,508 \ln(x)-79,773$	$0 \leq X \leq 5$	0,995
	$y=32,926 \ln(x)-98,97$	$0 \leq X \leq 5$	0,992

Во второй серии экспериментов нами была поставлена цель: изучить степень утилизации молочного сахара облигатными гомотрементативными видами лактобактерий *Lbm. bulgaricum* и *Lbm. acidophilum*. В качестве субстрата ферментации были выбраны молоко цельное и обезжиренное (таблица 1). Степень сбраживаемости молочного сахара определяли по содержанию молочной кислоты.

Для проведения эксперимента исследуемые молочные среды пастеризовали при $(85 \pm 5)^\circ\text{C}$, охлаждали до исследуемой температуры ферментации, вносили 5% закваски, перемешивали и помещали в термостат. Динамику утилизации лактозы в молочных средах определяли через каждый час в течение 6 ч. Опыты проводили в 3...5 кратной повторностях.

Исследовали:

1. Степень ферментации лактозы в цельном молоке в температурном режиме $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$, при постоянном ко-

личестве заквасок лактобактерий – 5% и времени ферментации – 6 ч.

2. Степень ферментации лактозы в обезжиренном молоке в температурном режиме $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$, при постоянном количестве заквасок лактобактерий – 5 % и времени ферментации – 6ч.

Полученные экспериментальные данные по цельному молоку статистически обработаны с расчетом величины достоверности аппроксимации R² и показаны графически на рисунках 4 и 5. Уравнения, описывающие зависимость степени ферментации лактозы при разных температурных режимах во времени в цельном молоке представлены в таблице 4.

Анализ полученных данных показывает, что зависимость степени ферментации лактозы в цельном молоке от продолжительности процесса описывается полиномом с достаточно высокой степенью аппроксимации. Обе культуры лактобактерий (*Lbm. bulgaricum* и *Lbm. acidophilum*) развиваясь в цельном молоке, проявили

себя в среднем одинаково – со степенью ферментации лактозы за 6 часов от 17,3

до 17,5 %. Титруемая кислотность заквасок составляла от 175 до 185 °Т.

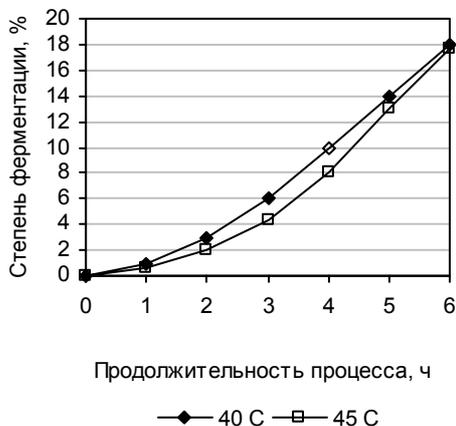


Рисунок 4 – Степень ферментации лактозы во времени *Lbm. bulgaricum*

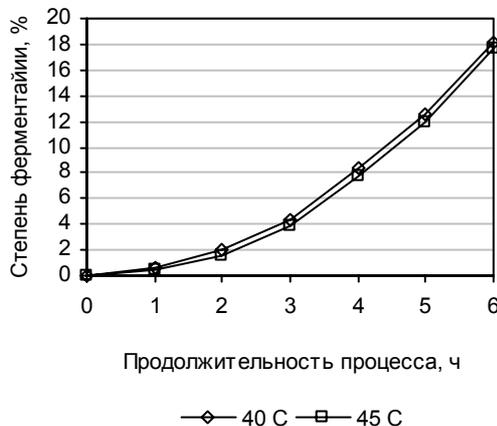


Рисунок 5 – Степень ферментации лактозы во времени *Lbm. acidophilum*

Таблица 5 – Зависимость степени ферментации лактозы в цельном молоке от продолжительности процесса

Исследуемые варианты	Уравнение регрессии	Ограничение	R ²
<i>Lbm. bulgaricum</i> 40 °C 45 °C	$y=0,462x^2+0,2606x-0,1331$ $y=0,2866x^2+1,4928x-0,7593$	$0 \leq X \leq 5$ $0 < X < 5$	0,99 0,981
<i>Lbm. acidophilum</i> 40 °C 45 °C	$y=0,479x^2+0,0519x-0,0587$ $y=0,4414x^2+0,5018x-0,4237$	$0 \leq X \leq 5$ $0 \leq X \leq 5$	0,999 0,986

Что касается культуральных свойств согласно источнику [6] оптимальной температурой для развития *Lbm. bulgaricum* является от 40 до 45 °С, а для *Lbm. acidophilum* от 37 до 38 °С. Экспериментальные данные этому не противоречат. Степень ферментации лактозы *Lbm. bulgaricum* с повышением температуры от (40±1) °С до (45±1) °С возрастает. При температуре ферментации (45±1) °С *Lbm. bulgaricum* сбраживают лактозу в 1,2-1,25 раза эффективнее. Культура *Lbm. acidophilum* проявляет обратную тенденцию с повышением температуры от (40±1) °С до (45±1) °С процесс сбраживания лактозы уменьшается в 1,15 раза.

Экспериментальные данные, получен-

ные при определении степени ферментации лактозы лактобактериями (*Lbm. bulgaricum* и *Lbm. acidophilum*) в обезжиренном молоке математически обработаны с расчетом величины достоверности аппроксимации R² и графически изображены на рисунках 6 и 7. Уравнения, описывающие зависимость степени ферментации лактозы при разных температурных режимах во времени в обезжиренном молоке представлены в таблице 5.

Анализ обработанных данных свидетельствует – зависимость степени ферментации лактозы в обезжиренном молоке от продолжительности процесса описывается полиномом с достаточно высокой степенью

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ГИДРОЛИЗА МОЛОЧНОГО САХАРА ЭНЗИМАТИЧЕСКИМ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБАМИ

аппроксимации. По степени сбраживания молочного сахара в обезжиренном молоке обе культуры лактобактерий проявили себя одинаково – степень ферментации за 6 ча-

сов составила в среднем от 15,5 до 16,1 %.

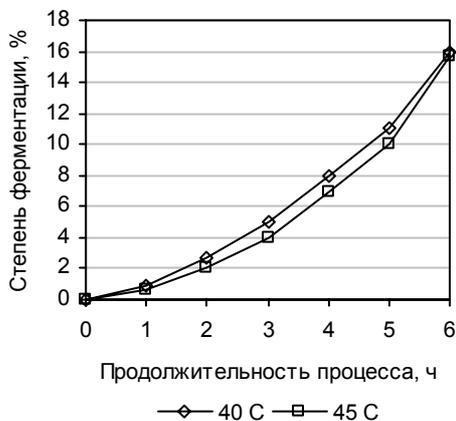


Рисунок 6 – Зависимость степени ферментации лактозы Lbm. Bulgaricum от продолжительности процесса

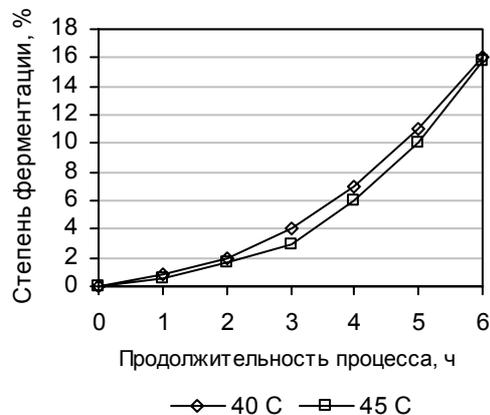


Рисунок 7 – Зависимость степени ферментации лактозы Lbm. Acidophilum от продолжительности процесса

Таблица 6 – Зависимость степени ферментации лактозы в обезжиренном молоке от продолжительности процесса

Исследуемые варианты	Уравнение регрессии	Ограничение	R ²
Lbm. bulgaricum 40 °C	$y=0,4273x^2+0,0898x+0,037$	$0 \leq X \leq 5$	0,995
45 °C	$y=0,3619x^2+0,6x-0,186$	$0 \leq X \leq 5$	0,993
Lbm. acidophilum 40 °C	$y=0,429x^2-0,1244x-0,018$	$0 \leq X \leq 5$	0,998
45 °C	$y=0,4948x^2-0,3694x+0,1063$	$0 \leq X \leq 5$	0,997

Наибольшая степень ферментации молочного сахара в обезжиренном молоке наблюдается для Lbm. bulgaricum при (45±1) °C, для Lbm. Acidophilum (40±1) °C. Данные температурные режимы являются оптимальными для развития лактобактерий.

Если сравнивать в целом степень утилизации лактозы в молочных средах, то в обезжиренном молоке (в последние два - три часа исследования) процесс ферментации ниже на 15-20 % чем в цельном молоке.

Таким образом, на основе проведенных исследований по изучению процесса гидролиза лактозы энзиматическим и микробиологическим способами считаем необходимым, сделать следующие выводы:

1. Ферментативный процесс гидролиза лактозы β-галактозидазой грибкового происхождения целесообразно проводить при

температурах от 45 до 50 °C, где продолжительность процесса гидролиза и концентрация вносимого ферментного препарата зависят от pH-среды. В кислой среде продолжительность гидролиза от 1 до 2 часов, доза фермента от 75 до 150 ед/г лактозы; в нейтральной среде продолжительность процесса от 5 до 6 часов, доза фермента от 300 до 450 ед/г. При таких условиях можно добиться от 75 до 100 % гидролиза лактозы.

2. Микробиологический процесс гидролиза лактозы является длительным. При использовании облигатных гомоферментативных видов лактобактерий Lbm. bulgaricum и Lbm. acidophilum при продолжительности процесса ферментации 6 часов и температурных режимах от 40°C до 45 °C можно достичь степени утилизации лактозы 17,5 %. При этом температурный оптимум

действия для *Lbm. bulgaricum* и *Lbm. acidophilum* составляет соответственно $(45\pm 1)^\circ\text{C}$ и $(40\pm 1)^\circ\text{C}$.

3. Наилучшей молочной средой для ферментативного способа гидролиза служит сыровотка так как ее pH-показатель соответствует кислой реакции среды. В обезжиренном и цельном молоке, которые имеют нейтральный показатель-pH гидролиз протекает более продолжительно. Время его осуществления можно регулировать, понижая показатель-pH цельного и обезжиренного молока, например, при комбинировании ферментативного и микробиологического способа, можно повысить степень гидролиза лактозы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богачкова Ж.А. Живите долго / Богачкова Ж.А., Кузнечикова И.И. // Молочная промышленность. – 1998. – № 7-8. – С. 6-7.
2. Жеребцов Н.А., Корнеева О.С., Фараджева Е.Д. Ферменты: Их роль в технологии пищевых продуктов: Учеб. пособие. – Воронеж: Изд-во Воронежского государственного университета. – 1999. – 120 с.
3. Корнеева О.С. Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2001. – 184 с.
4. Новое направление – безлактозные продукты // Химия. Химия и технология пищевых продуктов: РЖ/ ВИНТИ. – 2003. – 22. – С.16. – Eur. Dairy Mag. Lactose free products as a new market segment // 2003. – №1. – С. 20-22. Англ.
5. Рипелиус К. Максилакт – ферментная обработка молока решает проблему непереносимости лактозы / Рипелиус К., Двинский Б.М. // Молочная промышленность. – 1995. – №5. – С. 23-24.
6. Степаненко П.П. Микробиология молока и молочных продуктов: Учебник для ВУЗов. – Сергиев Посад: ООО «Все для Вас - Подмосковье». – 1999. – 415 с.