УДК 637.1.044:579.8

Л.А. Остроумов, В.Г. Гаврилов

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЛАКТОЗЫ ФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ β-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ

Исследован гидролиз лактозы под влиянием β-галактозидазы двух типов: продуцируемой дрожжами *K. Fragilis* и ферментного препарата «Максилакт». Изучена степень гидролиза лактозы и углеводный состав среды при разных дозах фермента, температуре, pH среды и продолжительности процесса. Доказано, что действие различных образцов промышленных препаратов β-галактозидазы на гидролиз лактозы имеет индивидуальные особенности, проявляя свою активность при разных внешних условиях. Для препарата Ha-lactise они составляли: pH 6,12, температура 45 °С, доза фермента 0,04–0,06 %, а для препарата Maxilact-2000: pH 7,5 и температура 20 °С. Работа основывалась на исследованиях Н.Н. Липатова, А.Г. Храмцова, Ю.Я. Свириденко и других.

Сыворотка, β-галактозидаза, активная кислотность, продолжительность, гидролиз, углеводы.

Введение

В последние годы резко возрос интерес работников научных учреждений и промышленности к проблеме полного и рационального использования молочной сыворотки. Это стало следствием перехода молочной промышленности на рыночные отношения, накопления огромного количества информации о сыворотке и путях ее переработки, зарубежного и отечественного опыта.

Всемирно известная и уважаемая научная школа академика Андрея Георгиевича Храмцова подняла науку о сыворотке и ее производных на принципиально новый уровень развития, раскрыв их биологическую, технологическую и экономическую сущность. В своих многочисленных фундаментальных трудах он показал значимость сыворотки для человечества. Изучив ее уникальный состав и свойства, проведя всеобъемлющий мониторинг и маркетинг сыворотки, показав энергосберегающие и экономически чистые способы ее промышленной переработки, а также возможность ее использования в пищевой промышленности, в медицине, производстве кормов для сельскохозяйственных животных, ветеринарии, а также в технических целях, А.Г. Храмцов заставил взглянуть на молочную сыворотку совершенно с других позиций, а именно как огромного резерва ценного для народного хозяйства сырья [1–4].

Все это подробно и доступно изложено в уникальной монографии А.Г. Храмцова «Феномен молочной сыворотки» (СПб.: Профессия, 2011. – 804 с.).

Основу сухих веществ молочной сыворотки (до 70 %) составляет молочный сахар (лактоза).

Лактоза относится к дисахаридам и при гидролизе распадается на глюкозу и галактозу. Связь между молекулой глюкозы и молекулой галактозы находится между четвертым атомом углерода глюкозы и первым углеродным атомом галактозы.

Ю.Я. Свириденко установлены закономерности ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки растворимой и иммобилизованной β-галактозидазой отечественного производства, установлено влияние на функциональные свойства концентратов сыворотки. Разработаны технологии и оборудование для производства концентратов сыворотки с гидролизованной лактозой и направления их использования в производстве пищевых продуктов. Определены рациональные условия гидролиза лактозы молочной сыворотки: температура 50 °С, pH 4,5–5,0, концентрация фермента 0,04 %, продолжительность гидролиза 10–12 часов [6, 7].

Существуют рекомендации, согласно которым для каждого молочного объекта разработаны специальные препараты β-галактозидазы, наиболее эффективно гидролизующие лактозу. В качестве одного из основных критериев рекомендуют учитывать вид микроорганизмов, продуцирующий ферментный препарат [5, 8]. Так, в молоке используют препараты из дрожжей *Saceharomyces fragilis, Streptococcus lactis, Candida preudotropicalis, Torylopsis versatilisk,* для гидролиза лактозы молочной сыворотки применяют препараты микроскопических грибов *Penicillium terlikowskii, P. Multicolor, P. Canescens, Mucor pusillus, Alternaria tenuis.*

С практической точки зрения использование сгущенной сыворотки с гидролизованной лактозой в производстве пищевых продуктов дает возможность замены свекловичного сахара. Кроме того, производится так называемое «низколактозное молоко».

Недостаточность β-галактозидазы приводит к неусвоению организмом лактозы. При этом лактоза из тонкого кишечника попадает в толстый, где осмотический (связывающий воду) эффект и сбраживание ее под влиянием кишечной микрофлоры являются причиной сильной диареи. У детей непереносимость лактозы (интолерантность) – наследственная болезнь, проявляющаяся в первые недели жизни ребенка, также связана с нарушением синтеза β-галактозидазы.

Таким образом, проблема направленного и управляемого гидролиза лактозы молочного сырья с получением меноз (глюкозы и галактозы) имеет глобальное значение. В этом направлении ведутся исследования во многих научных центрах страны и мира.

Нами изучались особенности гидролиза лактозы под влиянием ферментных препаратов Ha-lactis (β-галактозидаза фирмы «Хансен» из дрожжей *Kluyveromuces fragilis* и препарат «Максилакт»). Обращали внимание на дозу применяемого препарата, состав углеводов гидролизованной сыворотки, температуру процесса, pH среды и продолжительность гидролиза.

Объекты и методы исследований

Объектами исследований на разных этапах работы являлись:

– сыворотка молочная по ОСТ 4992;

– сыворотка молочная сухая по ТУ 49800;

– вода питьевая ГОСТ 2874;

– ферментный препарат β-галактозидазы (фирмы «Хр. Хансен», Дания, из дрожжей *K. fragilis*);

– ферментный препарат β-галактозидазы «Максилакт»;

– вспомогательное сырье и материалы, отвечающие требованиям действующей документации.

При выполнении работы использовались общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследований.

Активную кислотность измеряли на потенциометрическом анализаторе по ГОСТ 26781-85.

Определение массовой доли лактозы, глюкозы, галактозы, продуктов трансгликозилирования, а также олитгосахаридов гидролизованной сыворотки осуществляли методом тонкослойной хроматографии [10]. Массовую долю сахарозы определяли методом йодометрического титрования по ГОСТ 3628 (арбитражный метод). Метод основан на окислении редуцирующих сахаров, содержащих альдегидную группу, йодом в щелочной среде. Массовую долю сахарозы вычисляли по разности между количеством взятого и неизрасходованного йода, определяемого титрованием.

Степень гидролиза лактозы определяли хроматографическим и криоскопическим методами. При хроматографическом методе определение вели по формуле

$$\text{ст.гид.} = \frac{\text{м.д.гл.} + \text{м.д.гал.}}{\text{м.д.лак.}} \cdot 100,$$

где ст.гид. – степень гидролиза; м.д.гл. – массовая доля глюкозы; м.д.гал. – массовая доля галактозы; м.д.лак. – массовая доля лактозы (начальная).

Криоскопический метод заключается в определении концентрации истинно растворимых веществ в растворе по его точке замерзания. Для анализа использовали криоскоп фирмы «Криостар» (Германия). Так как при гидролизе молекула лактозы распадается на две молекулы, то в этом случае увеличение числа молекул ведет к снижению температуры замерзания. Конкретные значения степени гидролиза находили по специально построенному калибровочному графику, отражающему зависимость точки замерзания от степени гидролиза лактозы.

Результаты и их обсуждение

Влияние концентрации препарата Ha-Lactase (β-галактозидазы фирмы «Хр. Хансен»), кислотности среды и продолжительности процесса на степень гидролиза лактозы в сыворотке показано в табл. 1.

Таблица 1

Влияние активной кислотности на степень гидролиза лактозы

Доза β-галактозидазы, %	Степень гидролиза, %, при активной кислотности и продолжительности гидролиза											
	6,50				6,12				5,25			
	2 ч	3 ч	4 ч	24 ч	2 ч	3 ч	4 ч	24 ч	2 ч	3 ч	4 ч	24 ч
0,02	0	0	0	97	0	27	27	83	0	0	0	0
0,04	16	20	54	97	70	73	81	83	13	13	13	13
0,06	27	51	70	97	70	81	83	89	13	13	13	13
0,08	40	83	89	97	70	89	89	97	13	13	13	13

Анализ экспериментальных данных показывает, что степень гидролизованной лактозы в молочной сыворотке возрастает с увеличением концентрации фермента. Так, при дозе β-галактозидазы 0,04 % в течение 4 часов гидролизуется более 50 % лактозы в сыворотке с активной кислотностью 6,12, а при концентрации 0,02 % за такой же период времени в раскисленной до pH 6,50 сыворотке и в образцах с активной кислотностью 5,25 биологической трансформации лактозы вообще не отмечается. Использование концентрации препарата более 0,04 % в образцах с активной кислотностью 5,25 неоправданно, поскольку достигнуть удовлетворительной степени гидролиза (более 50 %), даже увеличив продолжительность процесса ферментации, не представляется возможным.

В раскисленной сыворотке активность β-галактозидазы, внесенной в повышенных концентрациях, судя по степени гидролиза, также выражена в меньшей степени, чем в образце, с pH 6,12. Данный факт, возможно, обусловлен снижением активности фермента за счет ионов Na^+, концентрация которых увеличивается в системе при раскислении с использованием щелочных агентов. Такая возможность изменения свойств β-галактозидазы отмечена профессором И.С. Хамагаевой [9].

Установлено, что при прочих равных условиях наибольшее количество лактозы в сыворотке гидролизуется при концентрации ионов водорода 6,12. При других значениях кислотности наблюдается заметное снижение степени гидролиза лактозы. Это послужило предпосылкой для выбора дозы фермента – 0,04–0,06 % при продолжительности процесса 3–4 часа (увеличение дозы фермента не рекомендуется, что связано с его высокой стоимостью). Отметим, что при использовании препарата для гидролиза лактозы в молоке рекомендуемая фирмой «Хр. Хансен» концентрация составляет 0,4 мл/дм^3 молока.

Для определения оптимальной температуры гидролиза лактозы в сыворотке проведена серия опытов. Полученные результаты показаны в табл. 2.

Таблица 2

Влияние температуры на степень гидролиза лактозы

Доза β-галактозидазы, %	Степень гидролиза, %, при температуре ферментации и продолжительности гидролиза											
	(35±1) °С				(40±1) °С				(45±1) °С			
	2 ч	3 ч	4 ч	24 ч	2 ч	3 ч	4 ч	24 ч	2 ч	3 ч	4 ч	24 ч
0,02	0	16	20	83	0	27	27	83	46	46	46	97
0,04	59	67	75	97	70	73	81	83	51	91	91	97
0,06	65	70	78	97	70	81	83	89	54	91	91	97
0,08	70	78	91	97	70	89	89	97	56	91	91	97

Выявлено, что при температуре (35±1) °С и рекомендованной нами концентрации фермента за 4 часа гидролизуется 75–78 % лактозы. За такой же период времени при температуре (40±1) °С – 81–83 % лактозы, а при (45±1) °С – 91 % лактозы в зависимости от концентрации фермента. Из этого следует, что оптимальной температурой ферментации является (45±1) °С. При 50 °С наблюдается низкая степень гидролиза лактозы в сыворотке даже после 24 ч вследствие снижения активности ферментного препарата.

Таким образом, по результатам проведенных исследований определены оптимальные условия проведения гидролиза в молочной сыворотке ферментным препаратом β-галактозидазы фирмы «Хр. Хансен»: активная кислотность среды pH 6,12; доза фермента 0,04–0,06 %, температура ферментации (45±1) °С.

На наш взгляд, величина степени гидролиза является объективной характеристикой, отражающей совокупные изменения концентрации лактозы в сыворотке. Этот показатель, однако, не позволяет полностью оценить изменения пищевой ценности, а также функциональных свойств сыворотки при создании на ее основе пищевых продуктов, в которых моно- и дисахара являются важным фактором оценки ее технологической пригодности. В связи с этим актуальным является изучение состава углеводов гидролизованной сыворотки. В табл. 3 показан углеводный состав гидролизованной сыворотки. Гидролиз проводили при pH 6,12 в течение 2, 3, 4 и 24 ч для вариантов дозы фермента 0,02; 0,04; 0,06 и 0,08 %.

Таблица 3

Влияние дозы β-галактозидазы
и продолжительности гидролиза на состав углеводов
гидролизованной сыворотки при pH 6,12

Доза β-галактозидазы, %	Массовая доля углеводов, %		
	лактозы	глюкозы	галактозы
Продолжительность гидролиза 2 ч			
0,02	3,70	0	0
0,04	1,11	1,29	1,17
0,06	1,11	1,23	1,17
0,08	1,11	1,23	1,14
Продолжительность гидролиза 3 ч			
0,02	2,70	0,50	0,46
0,04	0,71	1,35	1,21
0,06	0,70	1,42	1,34
0,08	0,41	1,56	1,45
Продолжительность гидролиза 4 ч			
0,02	3,70	0,50	0,46
0,04	1,70	1,49	1,35
0,06	1,11	1,42	1,40
0,08	0,41	1,56	1,45
Продолжительность гидролиза 24 ч			
0,02	0,70	1,50	1,38
0,04	0,70	1,50	1,35
0,06	0,41	1,56	1,48
0,08	0,11	1,70	1,59

Анализ приведенных результатов показывает, что в сыворотке при увеличении продолжительности гидролиза массовые доли глюкозы и галактозы за счет гидролиза лактозы постепенно увеличиваются, а массовая доля лактозы уменьшается. Увеличение дозы β-галактозидазы интенсифицирует гидролиз лактозы. При этом следует отметить интересную особенность: вследствие гидролиза лактозы образующиеся концентрации глюкозы и галактозы неодинаковы, что противоречит теоретическому выходу данных моносахаридов. С уменьшением концентрации ферментного препарата соотношение глюкозы и галактозы увеличивается в сторону повышения концентрации глюкозы. Напротив, при увеличении дозы фермента разница в концентрациях образующихся моносахаридов сокращается.

Следует отметить, что глюкозо-галактозный коэффициент, характеризующий направленность трансформации лактозы в результате гидролиза, колеблется от 1,11 до 1,05.

В рассматриваемом случае отмечается присутствие в сыворотке не только лактозы, глюкозы и галактозы, но и веществ (сахаридов), содержащих альдегидную группу, но не идентифицированных хроматографически.

На рис. 1 показано влияние массовой доли ферментного препарата, температуры и продолжительности гидролиза лактозы на изменение массовой доли неидентифицированных сахаров.

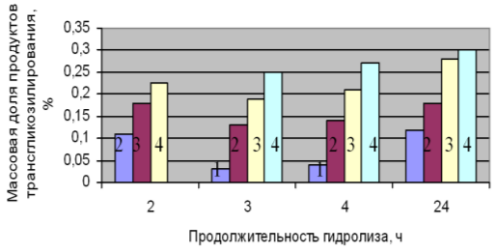

Рис. 1. Влияние дозы β-галактозидазы и продолжительности гидролиза на трансгликозилирующую активность при (35±1) °С: 1 – 0,02 %; 2 – 0,04 %; 3 – 0,06 %; 4 – 0,08 %

Установлено, что трансгликозилирующая активность фермента повышается с увеличением его массовой доли. Наиболее активно образование побочных продуктов гидролиза лактозы происходит при массовой доле β-галактозидазы 0,08 %. С увеличением продолжительности процесса гидролиза лактозы наблюдается увеличение содержания неидентифицированных сахаров независимо от массовой доли ферментного препарата.

Изучали процесс ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки при участии препарата Maxilact-2000. Степень ее гидролиза определяли в среде с различным значением pH, разной температурой и при разных дозах препарата. В данном случае степень гидролиза лактозы определяли криоскопическим методом.

Влияние pH на точку замерзания гидролизованного раствора лактозы приведено в табл. 4.

Таблица 4

Точка замерзания раствора лактозы при разных значениях pH

Продолжительность, ч	Точка замерзания (°С) при разных значениях pH				
	5,2	6,5	7,0	7,5	8,5
0	–0,298	–0,297	–0,299	–0,308	–0,291
2	–0,314	–0,307	–0,373	–0,425	–0,362
4	–0,314	–0,318	–0,394	–0,433	–0,369
6	–0,316	–0,324	–0,400	–0,433	–0,363

Величина pH по-разному влияла на точку замерзания раствора. При pH 5,2 величина точки замерзания слегка понизилась за первые два часа, а затем процесс приостановился. При pH 6,5 точка замерзания понижалась все шесть часов опыта, но скорость процесса была весьма замедленной. Она несколько ускорилась при pH 7,0. Наиболее заметные изменения величины точки замерзания наблюдали при pH 7,5. Дальнейший сдвиг pH до 8,5 привел к понижению роста величины точки замерзания.

В целом понижение температуры при pH 5,2 составило минус 0,018 °С, при pH 6,5 – минус 0,027 °С, при pH 7,0 – минус 0,101 °С, при pH 7,5 – минус 0,125 °С и при pH 8,5 – минус 0,072 °С.

Интерпретация температур точек замерзания на калибровочный график зависимости понижения температуры замерзания от степени гидролиза лактозы позволила определить ее конкретные значения (рис. 2).

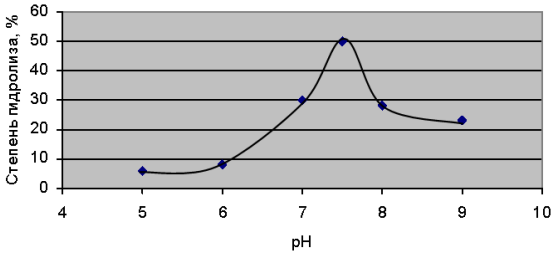

Рис. 2. Зависимость степени гидролиза лактозы от pH среды

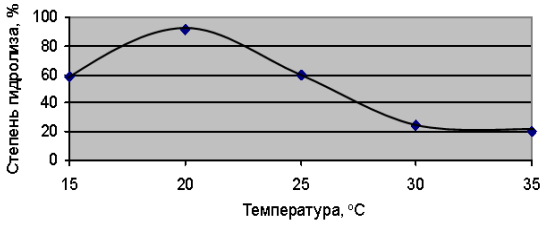

Рис. 3. Зависимость степени гидролиза лактозы от температуры

Среди исследуемых вариантов большая степень гидролиза лактозы отмечалась при pH 7,5.

Влияние температурного фактора на замерзание ферментируемого раствора лактозы показано в табл. 5.

Таблица 5

Точка замерзания раствора лактозы при разных температурных режимах

Продолжительность, ч	Точка замерзания (°С) при разных температурах (°С)				
	15	20	25	30	35
0	–0,289	–0,310	–0,308	–0,306	–0,311
2	–0,389	–0,522	–0,413	–0,369	–0,375
4	–0,411	–0,547	–0,431	–0,367	–0,376
6	–0,427	–0,548	–0,434	–0,366	–0,375

Наибольшие изменения точки замерзания происходили при температуре 20 °С.

Зависимость степени гидролиза от температуры показана на рис. 3. Она составляла при 15 °С – 58 %, при 20 °С – 92 %, при 25 °С – 60 %, при 30 °С – 25 %.

Установлено, что действие различных образцов промышленных препаратов β-галактозидазы на гидролиз лактозы имеет индивидуальные особенности, проявляя свою активность при разных внешних условиях. Для препарата Ha-lactise они составляли: pH 6,12, температура 45 °С, доза фермента 0,04–0,06 %, а для препарата Maxilact-2000: pH 7,5 и температура 20 °С.

Список литературы

1. Храмцов, А.Г. Молочная сыворотка. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
2. Храмцов, А.Г. Феномен лактозы и ее производных // Молочная промышленность. – 2005. – С. 48–49.

3. Храмцов, А.Г. Новые направления в разработке продуктов функционального питания / А.Г. Храмцов, И.А. Евдокимов, С.А. Рябцева // Сборник научных трудов СевКавГТУ. Серия «Продовольствие». – Ставрополь: СевКавГТУ, 2005. – С. 14–20.
4. Храмцов, А.Г. Феномен молочной сыворотки. – СПб.: Профессия, 2011. – 804 с.
5. Липатов, Н.Н. Молочная промышленность в XXI век // Вопросы питания. – 1994. – С. 39–42.
6. Свириденко, Ю.Я. Использование процесса гидролиза лактозы в молочной промышленности / Ю.Я. Свириденко, В.Ю. Смурыгина, Ю.А. Боровкова, Г.В. Авдолян, В.Ф. Панова, Л.В. Абдуллаева / АгроНИИТЭИ. – М., 1991. – 33 с.
7. Свириденко, Ю.Я. Гидролиз лактозы фильтрата сыворотки иммобилизованной бета-галактозидазой / Ю.Я. Свириденко, В.Ю. Смурыгина, Ю.А. Боровкова, Л.А. Нахопетян, Н.М. Самошина // Молочная промышленность. – 1985. – С. 14–17.
8. Нахапетян, Л.А. Получение глюкозо-галактозных сиропов из молочной сыворотки / Л.А. Нахапетян, Л.И. Можихина // Биотехнология. – 1998. – № 1. – С. 4–19.
9. Хамагаева, И.С. Теоретическое обоснование и разработка технологии кисломолочных продуктов на основе использования β-галактозидазы и бифидобактерий: автореф. дис. … д-ра техн. наук. – М., 1989. – 34 с.
10. Серов, А.В. Теоретическое обоснование и экспериментальные исследования химико-технологических проблем получения, определения и использования лактозы и ее производной лактулозы: дис. … д-ра техн. наук. – Ставрополь, 2004. – 309 с.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

L.A. Ostroumov, V.G. Gavrilov

BIOTRANSFORMATION OF LACTOSE ENZYME PREPARATIONS β-GALACTOSIDASE

Investigated is the hydrolysis of lactose under the influence of β-galactosidase of two types: the one produced by the *K. Fragilis* fungi and the “Maksilat” enzyme preparation. The degree of lactose hydrolysis and carbohydrate composition of the medium at different doses of enzyme, temperature, pH and duration of the process is studied. It is proved that the effects of different samples of commercial preparation of β-galactosidase on the hydrolysis of lactose have individual characteristics showing their activity in different environmental conditions. For Ha-lactise preparation they were as follows: pH 6,12, the temperature of 45 ^{0}C, the enzyme dose of 0,04–0,06 % and for Maxilakt-2000 preporation: pH 7,5 and the temperature of 20 ^{0}C. The study is based on the researches of N.N. Lipatov, A.G. Khramtsova, U.Y. Sviridenko and others.

Serum, β-galactosidase, active acidity, duration, hydrolysis, carbohydrates.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru