

УДК 577.152.3

Е. В. Скворцов, Ю. А. Морозова, Л. К. Букуру,  
Ф. К. Алимova, З. А. Канарская

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ $\beta$ – ГАЛАКТОЗИДАЗЫ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА ЛАКТОЗЫ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ

Ключевые слова:  $\beta$ -галактозидаза, ферментативный гидролиз.

Проведено исследование гидролиза лактозы молочной сыворотки коммерческим препаратом  $\beta$ -галактозидаз - «Лактазар». Определена максимальная глубина гидролиза лактозы молочной сыворотки, которая составила 96 %.

Keywords:  $\beta$ -galactosidase, enzymatic hydrolysis.

A study whey lactose hydrolysis by commercial  $\beta$ -galactosidase preparation - "Laktazar" made. Maximum depth of the hydrolysis whey lactose determined, it amounted 96 %.

**Актуальность.** Переработка и рациональное использование молочной сыворотки (МС) является актуальной для всех стран с развитой молочной промышленностью [1]. Известно, что при переработке молока на творог, сыры и казеин в сыворотку переходят 50 % сухих веществ (СВ) молока, в том числе 20 % исходных белков молока. При этом основным компонентом в составе СВ является лактоза (более 70 %), выполняющая важную физиологическую роль в организме человека [2]. В молочную сыворотку переходят практически все соли, макро- и микроэлементы молока, а также водорастворимые витамины [3]. Однако, состав молочной сыворотки, так же как и молока, непостоянен и зависит от периода лактации, кормления, возраста и породы животного, климатических и географических условий [4]. Наиболее существенно на качество молочного сырья влияет время года, т.к. в течение года резко изменяется состав рационов кормления, условий содержания, обмен веществ в организме лактирующих коров. Богатая и гетерогенная по содержанию биологически активных веществ сыворотка является перспективным сырьевым ресурсом для пищевой промышленности [5].

Использование микроорганизмов (МО) - один из основных методов обогащения молочного сырья, в том числе и МС, белком [6]. На этом методе основано производство широкого ассортимента продуктов питания и полуфабрикатов для пищевых (напитки, сыворотка для хлебопекарной и кондитерской промышленности), кормовых (сыворотка обогащенная, закваски для силосования кормов.) и технических (этиловый спирт, молочная кислота, столовый уксус, лизин и др.) целей. Для этого в МС после предварительной обработки вносят различные закваски, которые готовят на чистых культурах определенных видов МО (молочнокислых, уксуснокислых бактерий, дрожжей) [7].

В результате молочнокислого брожения происходит расщепление лактозы до глюкозы и

галактозы с последующим микробиологическим синтезом молочной кислоты [8].

Параллельно с молочнокислым брожением, как правило, протекают побочные процессы, которые обуславливают накопление продуктов распада лактозы - летучих кислот, спиртов, диацетила. Брожение прекращается самопроизвольно, когда ферменты МО гидролизуют лишь часть (20 %) лактозы, поскольку образующаяся молочная кислота инактивирует их развитие [9].

Применение ферментов значительно увеличивает скорость и специфичность химических реакций, что позволяет сократить продолжительность многих технологических процессов с определенной направленностью при получении ценных компонентов продуктов питания.

Натуральная МС содержит значительное количество ароматических соединений. Технологическая обработка и ферментативный гидролиз лактозы увеличивают их количество, что благоприятно отражается на возможности использования в хлебопечении, производстве безалкогольных напитков и других пищевых продуктов.

Гидролиз белков МС до пептидов и аминокислот осуществляется для повышения биологической ценности и качества (прозрачность и отсутствие осадка) продуктов. Наиболее эффективны следующие протеолитические ферменты: протеазы *Actinomyces vulgaris* (88 % гидролиза), трипсин (76 %), протофрадин и панкреатин (67 %), куриный пепсин (54 %), протоальбин (47 %). В процессе гидролиза в МС изменяется количество аминокислот [10]. В гидролизованной МС содержится весь набор аминокислот, заметно увеличивается их содержание в сравнении с исходной сывороткой, особенно лейцина и глутаминовой кислоты. Появляются оксиаминокислоты (серин, треонин), двухосновные (гистидин, аргинин), а также ароматические и серосодержащие аминокислоты.

Из такой МС готовят сгущенные и сухие обогащенные концентраты. В производстве молочного сахара гидролиз белков позволяет улучшить его качество и стабилизировать технологический процесс. На основе ферментации МС можно приготовить белковые гидролизаты для микробиологических питательных сред [3].

Исследование и оптимизация процесса гидролиза лактозы молочной сыворотки является весьма актуальной задачей. Осуществление гидролиза позволяет получить моносахара. Наличие в растворе гидролизата моносахаров открывает несколько направлений переработки сыворотки. На основе гидролизата молочной сыворотки могут быть получены высоковитаминные сладкие напитки, сбраживанием гидролизатов могут быть получены слабоалкогольные напитки, сушкой гидролизатов могут быть получены заменители традиционного пищевого сахара. Решение проблемы глубокого гидролиза лактозы позволит активизировать эти направления переработки молочной сыворотки.

Фермент  $\beta$ -галактозидаза [11] - расщепляет лактозу молока. Гидролиз лактозы в глюкозу и галактозу с помощью  $\beta$ -галактозидазы является одним из важных процессов в пищевой промышленности и имеет важное технологическое и экологическое значение [12]. В молочной промышленности  $\beta$ -галактозидазы используются для предотвращения кристаллизации лактозы, для увеличения сладости молочных продуктов [13]. Коммерческие лактазы производятся из дрожжей рода *Kluyveromyces Lactis* и *Kluyveromyces fragilis*, и плесневых грибов рода *Aspergillus niger* и *Aspergillus oryzae* [14], бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* [15].

В результате ферментативного гидролиза лактозы  $\beta$ -галактозидаза в моносахара превращается до 50 - 70 % лактозы, увеличиваются сладость и усвояемость готового продукта.

*Цель работы* – определение эффективности применения коммерческого препарата  $\beta$ -галактозидазы (лактаз) «Лактазар» для гидролиза лактозы молочной сыворотки.

Для достижения данной цели поставлены *задачи*:

1. Провести ферментативный гидролиз лактозы молочной сыворотки.
2. Провести хроматографическое исследование содержания лактозы в гидролизатах.
3. На основании данных хроматографических исследований определить эффективность гидролиза лактозы молочной сыворотки  $\beta$ -галактозидазой.

## Материалы и методы

*Объект исследования.* Коммерческий препарат  $\beta$ -галактозидаз (лактаз) - «Лактазар», производитель ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия. Содержит фермент лактазу.

*Определение  $\beta$ -галактозидазной активности с модификациями.* Исследование

проводили в трех повторностях [16]. Субстрат для исследования активности  $\beta$ -галактозидаз готовили следующим образом, 750 мг лактозы помещали в 40 мл ацетатного буфера. pH раствора доводили до 7.0. Объем раствора доводили до 50 мл ацетатным буфером.

Разбавленный образец  $\beta$ -галактозидаз в количестве 0.06 мл помещали в пробирку. Пробирку помещали на 5 минут в 50 °С на водяную баню. Добавляли 0.6 мл субстрата. Через 20 минут инкубация прерывалась добавлением 0.3 мл раствора динитросалициловой кислоты (DNSA).

Для построения калибровочного графика использовали стандарты глюкозы. Стандарты готовили аналогично подготовке образцов для анализа без инкубирования при 50 °С, а сразу добавляли DNSA.

После добавления DNSA, полученный раствор инкубировали точно 10 минут в кипящей водяной бане, затем охлаждали в ледяной бане 5 минут, добавляли 3 мл воды и перемешивали. Абсорбцию измеряли при 540 нм на спектрофотометре «Shimadzu 1800». Одна единица активности энзима (IU) соответствует количеству фермента, вызывающего выход одного мкмолья восстанавливающих сахаров в минуту при гидролизе субстрата. Выход восстанавливающих сахаров определяли по калибровочным графикам, построенным по глюкозе.

*Гидролиз молочной сыворотки.* Для приготовления проб проводили гидролиз творожной молочной сыворотки коммерческим препаратом лактазы «Лактазаром» (10:1). Готовые смеси выдерживали 24 часа при температуре 24 °С. Далее к пробе добавляли ацетонитрил в соотношении 1:4.

*Анализ гидролизатов методом высоко – эффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).* Для анализа моносахаридного состава гидролизата методом жидкостной хроматографии был применен хроматограф Waters [17]. Разделение моносахаридов проводилось на хроматографической колонке Supelcosil LC-NH2 58338 высотой 250 мм и диаметром 4.6 мм. В качестве элюента при проведении исследований использовали ацетонитрил. Для приготовления 1 л элюента смешивали 750 мл ацетонитрила с 250 мл особо чистой воды. Полученную смесь фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм с помощью вакуумного насоса и установки для вакуумной фильтрации.

Для регистрации выходящих фракций моносахаридов применялся рефракционный детектор Refractive Index Detector Waters, объем инъекции анализируемого раствора - 20 мкл, скорость элюирования 0.3 мл/мин. Калибровку проводили, используя в качестве стандартов растворы лактозы в смеси ацетонитрила и воды (80:20) приготовленные в двух концентрациях: 5 г/л, 1 г/л.

Вычисление концентрации лактозы в исследуемом растворе проводили по площади пиков, пользуясь программой Breeze, в автоматическом режиме хроматографа.

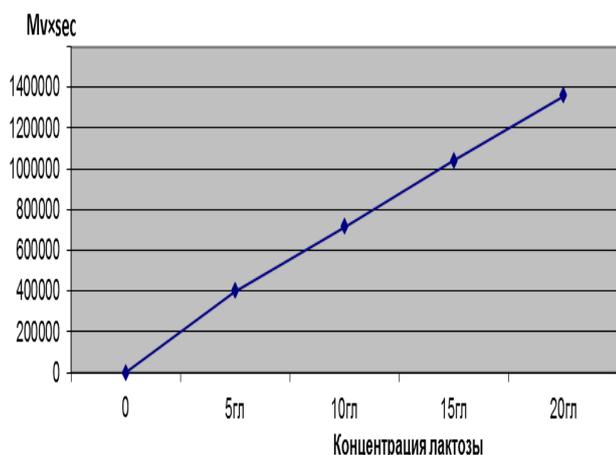
*Статистическая обработка данных.* Для статистической обработки данных использовали программу Excel. Для сравнения применяли интервальные оценки. Уровень значимости  $p < 0.05$ . Данные представлены как среднее трех повторностей [18, 19].

## Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что  $\beta$ -галактозидазная активность коммерческого концентрированного препарата  $\beta$ -галактозидаз «Лактазар» составляет 33350 IU/ml.

На хроматограммах стандартных растворов лактозы отмечено время появления пика лактозы у стандартного образца концентрации 1 г/л: 19,579 мин, площадь пика 96496 Mv $\times$ sec. У стандарта 5 г/л, соответственно, 19.572 мин, площадь пика 327122 Mv $\times$ sec. Площади пиков пропорциональны содержанию лактозы в стандартных образцах.

Исходя из полученных результатов, построен калибровочный график зависимости площади пика от концентрации лактозы в стандартном растворе (рис. 1).



**Рис. 1 - Калибровочный график зависимости площади пика от концентрации лактозы для определения концентрации лактозы в гидролизатах молочной сыворотки**

В исходной молочной сыворотке, пик лактозы появился на 19.495 мин и его площадь составляет 893298 Mv $\times$ sec. Используя калибровочный график, находим, что концентрация лактозы в образце сыворотки для хроматографирования составляет 12.5 г/л. С расчетом пятикратного разведения находим, что содержание лактозы в исходной сыворотке 12.5 г/л  $\times 5 = 62.5$  г/л.

Эффективность ферментативного гидролиза лактозы  $\beta$ -галактозидазой определяют по следующей формуле:

$$\mathcal{E} = \frac{C_u - C_k}{C_u} \cdot 100,$$

где  $\mathcal{E}$  - эффективность ферментативного гидролиза лактозы, % гидролиза;

$C_u$  - исходная концентрация лактозы в молочной сыворотке до гидролиза, г/л;

$C_k$  - конечная концентрация лактозы в гидролизате молочной сыворотки, г/л.

На хроматограмме гидролизата молочной сыворотки концентрированным препаратом  $\beta$ -галактозидаз «Лактазар» пик лактозы появился на 19.706 мин с площадью пика 63819 Mv $\times$ sec. Концентрация лактозы снизилась до 2.5 г/л. Эффективность гидролиза лактозы препаратом  $\beta$ -галактозидаза «Лактазар» составила 96 %.

## Выводы

Хроматографические исследования гидролизатов показали снижение содержания лактозы в молочной сыворотке при гидролизе препаратом  $\beta$ -галактозидаза «Лактазар».

Примененная методика с модификациями авторов хроматографического определения лактозы в молочной сыворотке и в ее гидролизатах, а также чувствительность рефрактометрического детектора позволяет определять концентрацию лактозы с достаточно высокой точностью.

На основании данных хроматографических исследований определено, что эффективность гидролиза лактозы молочной сыворотки  $\beta$ -галактозидазой коммерческого препарата «Лактазар» составила 96 %. Применение  $\beta$ -галактозидазы для гидролиза лактозы значительно эффективней применения МО.

## Литература

1. Алексеев В.В., Алексеев П.В., Поникаров И.И. Вест. Казан. техн. унив. Т. 16. № 21. С.218 – 220. (2013).
2. Донская Г.А. Переработка молока. № 12 (156). С. 52 – 53. (2012).
3. Кунижев С.М., Шуваев В.А. Новые технологии в производстве молочных продуктов. - М.: ДеЛи принт, 2004. - 203 с.
4. Храмов А.Г. Молочная сыворотка. - М.: Агропромиздат, 1990. - 240 с.
5. Храмов А.Г., Нестеренко П.Г. Технология продуктов из молочной сыворотки. - М.: ДеЛи принт, 2004. - 587 с.
6. Шевелев К. Сыворотка - ценный субпродукт. // Молочная промышленность. - 2005. - №1. - С. 60-61.
7. Шуляк Т.Д. Ферментация различных видов молочной сыворотки молочнокислыми бактериями. // Хранение и переработка сельхозсырья. - 2005. - №7. - С. 35-38.
8. Тунакова Ю.А., Шмакова Ю.А., Валеев А.Р. Вест. Казан. техн. унив. Т. 16. № 9. С.190 – 194. (2013).
9. Алексеев В.В., Поникаров И.И. Вест. Казан. техн. унив. Т. 17. № 6. С.216 – 219. (2014).
10. Constana S. Biotechnological valorisation of whey // Innovative Romanian Food Biotechnology. Vol. 10, P. 1-8. (2012).
11. Calandri C. J Biocatal Biotransformation. 2:1. P. 1-7. (2013).
12. Maity M. Research Journal of Recent Sciences. Vol. 2 (8). P. 92 – 94. (2013).
13. Princely S. European Journal of Experimental Biology. 3(2). P. 242 – 251. (2013).

14. *Swati S.* Journal of Environmental Research And Development. Vol. 6. № 3. A. P. 721 – 726. (2012).
15. *Mozumder N. H. M. R. J. Sci. Res.* 4 (1). P. 239 - 249. (2012).
16. *König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K.* Anal Bioanal Chem. 374. P. 80 – 87. (2002).
17. *Bartolome B., Santos M., Jimenez J.J.* Journal of Cereal Science. 36. P. 51 – 58. (2002).
18. *Акберова Н. И.* Описательная статистика. Интервальные оценки: Учебно-методическое руководство и сборник задач к практическим занятиям по курсу «Математические методы в биохимии»//Казан. гос. унив. 40с. (2004).
19. *Warmerdam, A.* Springer Plus. 2:402. P.1-8. (2013).

---

© **Е. В. Скворцов** – канд. биол. наук, директор ООО «Биотех», [eskvortsov@rambler.ru](mailto:eskvortsov@rambler.ru); **Ю. А. Морозова** – асп. К(П)ФУ, [maroz\\_@mail.ru](mailto:maroz_@mail.ru); **Л. К. Букуру** – студ. К(П)ФУ; **Ф. К. Алимova** – д-р биол. наук, зав. каф. биохимии К(П)ФУ; **З. А. Канарская** – канд. тех наук, доц. каф. пищевой биотехнологии КНИТУ, [zosya\\_kanarskaya@mail.ru](mailto:zosya_kanarskaya@mail.ru).

© **E. V. Skvortsov** - Ph.D. biol. sci «Biotech» Ltd., director, [eskvortsov@rambler.ru](mailto:eskvortsov@rambler.ru); **Yu. A. Morozova** – Kazan federal university, post – graduate student, [\\_maroz\\_@mail.ru](mailto:_maroz_@mail.ru); **L. K. Bukury** – Kazan federal university, student; **F. K. Alimova** – Prof. biol., Kazan federal university, head of biochemistry department; **Z. A. Kanarskaya** – Ph.D. tech. sci., docent dep. Food biotechnology KNRTU, [zosya\\_kanarskaya@mail.ru](mailto:zosya_kanarskaya@mail.ru).