

DOI: 10.15593/2224-9400/2019.4.03

УДК 577.15:664.162.036.1

Н.Б. Ходяшев, Е.А. Вихарева, Е.А. РатниковПермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ
НА ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ ЛАКТОЗЫ
МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ**

Молочная сыворотка является вторичным молочным сырьем, содержит в своем составе углеводы, белки, минеральные соли, витамины, микроэлементы. Основной компонент сыворотки – лактоза. Известно превращение лактозы в моносахара – глюкозу и галактозу с участием фермента β -галактозидазы. Однако малоизученным является влияние типа фермента, температурного фактора, соотношения фермент–субстрат на полноту процесса ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки.

В настоящей работе исследовано влияние температуры и других факторов ферментативного гидролиза лактозы молочной творожной сыворотки. В качестве фермента использован коммерческий препарат β -галактозидаза – «Лактазар» (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия). Показано, что в области температур 30–45 °С наблюдается увеличение скорости ферментативного гидролиза. Дальнейшее повышение температуры до 50 °С приводит к уменьшению скорости образования моносахаров – глюкозы и галактозы. Такой характер влияния температурного фактора связан со структурными изменениями в β -галактозидазе препарата «Лактазар» и снижением ее ферментативной активности.

В результате расчета по экспериментальным данным для температур 30–50 °С величина кажущейся энергии активации ферментативного гидролиза составила 11,8 кДж/моль.

Проведено исследование влияния соотношения массы введенного препарата «Лактазар» к объему сыворотки с содержанием лактозы в пределах 36,4–42,2 г/л. Установлено, что добавление $\approx 0,1$ мас. % препарата β -галактозидаза – «Лактазар» достаточно для обеспечения ≈ 90 % степени превращения лактозы молочной сыворотки в моносахара при температуре 45 °С. При этом период времени ≈ 6 ч достаточен для достижения указанной степени превращения.

Ключевые слова: ферментативный гидролиз, лактоза, молочная сыворотка, β -галактозидаза.

N.B. Hodyashev, E.A. Vihareva, E.A. Ratnikov

Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

**STUDY OF THE INFLUENCE OF INDIVIDUAL FACTORS
ON THE ENZYMATIC HYDROLYSIS OF WHEY LACTOSE**

Whey is a secondary raw milk, contains carbohydrates, proteins, mineral salts, vitamins, microelements. The main component of whey is lactose. It is known that lactose is

converted into a monosugar - glucose and galactose with the participation of the enzyme β -galactosidase. However, the effects of the type of enzyme, temperature factor, and the ratio of enzyme-substrate on the complete process of the enzymatic hydrolysis of whey lactose are poorly understood.

In this work, we studied the effect of temperature and other factors of the enzymatic hydrolysis on lactose in milk curd whey. The commercial preparation β -galactosidase - Lactazar, produced by Pharmstandard-Leksredstva OJSC, Russia, was used as an enzyme. It was shown that in the temperature range of 30-45 °C an increase in the rate of enzymatic hydrolysis is observed. A further increase in temperature to 50 °C leads to a decrease in the rate of formation of monosaccharides: glucose and galactose. This influence of the temperature factor is associated with structural changes in the β -galactosidase of the Lactazar preparation and a decrease in its enzymatic activity.

The calculation according to experimental data for temperatures of 30-50 °C of the apparent activation energy of enzymatic hydrolysis gives a value of 11.8 kJ/mol.

A study of the effect of the ratio of the mass of the administered Lactazar preparation to the whey volume was made with a lactose content in the range of 36.4-42.2 g/l . It was found that the addition of ~0.1 wt. % of the preparation β -galactosidase - Lactazar is sufficient to provide ~90% degree of conversion of whey lactose in monosugar at a temperature of 45 °C. Moreover, a time period of ~6 hours is sufficient to achieve the specified degree of conversion.

Keywords: *enzymatic hydrolysis, lactose, whey, β -galactosidase.*

В ходе переработки молока на такие продукты, как сыр, творог, казеин, образуется молочная сыворотка [1]. Молочная сыворотка является ценным питательным сырьем, содержит в своем составе до 5,2 мас. % лактозы, до 1,5 мас. % белковых веществ, до 0,9 мас. % минеральных солей [1, 2]. Кроме того, в ее состав входят микроэлементы, водорастворимые витамины [3].

Существуют различные методы переработки молочной сыворотки. Они включают в себя как выделение отдельных компонентов сыворотки, сухого остатка в целом, так и использование различных биотехнологических методов [1, 4–6].

Поскольку, с одной стороны, многокомпонентный состав сыворотки, а с другой – высокое содержание воды, одним из эффективных направлений ее переработки могут выступать биотехнологические методы трансформации с получением соответствующих продуктов.

Одними из основных компонентов молочной сыворотки выступает лактоза. При переработке молока она практически на 99,5 % переходит в состав молочной сыворотки [4]. Известны методы ее биотрансформации и, в частности, ферментативного гидролиза с последующим переводом в моносахара – глюкозу и галактозу [7–9]. Для этой цели используется фермент β -галактозидаза.

Фермент β -галактозидазу получают различными способами [10, 11]. Дрожжи и бактерии синтезируют внутриклеточный фермент. Он характеризуется относительно узким диапазоном действия по величине рН среды и эффективен при относительно невысоких температурах [10, 11]. В то же время β -галактозидазы грибного происхождения являются в основном внеклеточными. Ферменты этого типа имеют множественные формы, в молекулу белка входит углеводный остаток, придающий ферментам длительную стабильность к внешним факторам (рН, температура) [10].

Существующие результаты исследования ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки показывают высокую степень ее превращения в моносахара (до 96 %) с использованием устойчивых к внешним факторам ферментов [8]. В то же время влияние таких факторов, как температура гидролиза, соотношения фермент – субстрат (сыворотка) остается изученным в недостаточной степени.

Цели настоящей работы:

- исследование ферментативного гидролиза лактозы молочной творожной сыворотки с использованием коммерческого препарата β -галактозидаза – «Лактазар» (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия) при различных температурах;
- определение кажущейся энергии активации процесса ферментативного гидролиза;
- установление кинетических характеристик процесса ферментативного гидролиза (оптимального соотношения фермент–субстрат, продолжительности гидролиза).

Материалы и методы. В исследовании применяли молочную творожную сыворотку с массовой долей лактозы не менее 3,5 мас. % по ГОСТ 34352–2017. Сыворотка молочная – сырье. Содержание лактозы в составе сыворотки находилось в пределах 36,4–42,2 г/л. Для ферментативного гидролиза использовали коммерческий препарат β -галактозидаза – «Лактазар» (ОАО «Фармстандарт-Лексредства», Россия).

Определение лактозы в составе исходной молочной сыворотки осуществляли фотоколориметрическим методом. Калибровочную зависимость строили для стандартных растворов лактозы в диапазоне концентраций от 0,0625 до 1 г/л. Отбирали по 2 мл каждого стандартного раствора, вносили в пробирки и добавляли равные объемы ДНСК-реагента на основе 3,5-динитросалициловой кислоты.

Подготовку ДНСК-реагента осуществляли в соответствии с методикой, изложенной в практикуме [12]. Контрольную пробу готовили на дистиллированной воде с добавлением равного объема ДНСК-реагента. Далее пробирки помещали в кипящую водяную баню на 5 мин, после чего охлаждали и определяли оптическую плотность каждой пробы при длине волны $\lambda = 540$ нм. Для измерений использовали фотоэлектроколориметр АР-101.

Молочную сыворотку предварительно разбавляли дистиллированной водой и в дальнейшем использовали для определения содержания лактозы в соответствии с изложенной методикой.

Определение суммарного содержания глюкозы и галактозы в составе гидролизатов молочной сыворотки также осуществлялось фотоколориметрическим методом. Для этой цели использовали 6%-й раствор молибдата аммония, фосфат-фталатный буфер с рН = 5,3, глюкозно-галактозный стандартный раствор с содержанием 5 г/л глюкозы и 5 г/л галактозы, приготовленный на 0,1%-м растворе бензойной кислоты. Рабочие растворы для построения калибровочной зависимости готовили также с использованием 0,1%-го раствора бензойной кислоты [13]. Линейность калибровочной зависимости соблюдалась в диапазоне суммарного содержания глюкозы-галактозы 0–3 мг/мл. Измерения проводили на фотоэлектрокалориметре АР-101, длина волны $\lambda = 600$ нм.

Определение кажущейся энергии активации ферментативного гидролиза лактозы проведено путем обработки экспериментальных зависимостей, полученных для различных температур в координатах «суммарная концентрация глюкозы и галактозы – время». Использованы линейные участки зависимостей в интервале времени гидролиза 1–4 ч. Эксперименты проводились в термостате при перемешивании в следующих условиях: объем сыворотки 100 мл, количество препарата β -галактозидаза «Лактазар» – 0,15 г.

Для расчета наблюдаемой скорости ферментативного гидролиза использовали зависимость

$$v_{\text{набл}} = \frac{C_2 - C_1}{\tau_2 - \tau_1}, \quad (1)$$

где τ_1 и τ_2 – время отбора проб для последующего определения суммарной концентрации глюкозы и галактозы, ч; C_1 , C_2 – соответственно

экспериментально установленная начальная и конечная суммарная концентрация глюкозы и галактозы (г/л) для времени τ_1 и τ_2 .

Кажущуюся энергию активации (E_a) ферментативного гидролиза определяли по зависимости [14]:

$$E_a = \frac{\ln v_{\text{набл}, T_2} - \ln v_{\text{набл}, T_1}}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} \cdot R, \quad (2)$$

где $v_{\text{набл}, T_1}$, $v_{\text{набл}, T_2}$ – наблюдаемые скорости процесса, соответственно при температурах T_1 и T_2 ; R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль·К).

Исследования, связанные с получением других временных характеристик ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки, осуществляли в термостатируемой качалке при скорости вращения 100 об/мин.

Результаты и обсуждение. Исследовано влияние температурного фактора в области температур 30–50 °С на изменение суммарной концентрации глюкозы и галактозы в составе молочной сыворотки. Результаты эксперимента представлены на рис. 1.

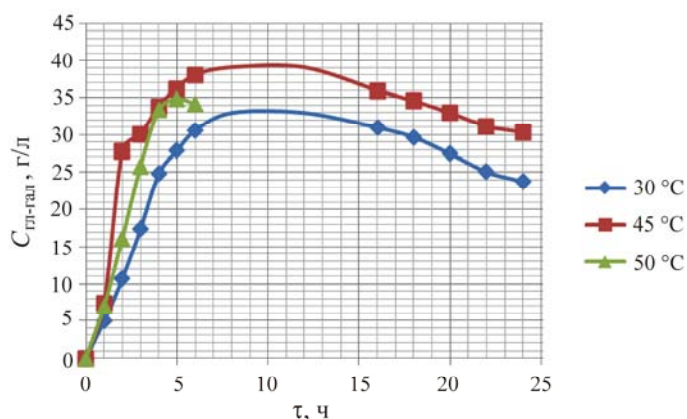


Рис. 1. Зависимости суммарных концентраций глюкозы и галактозы ($C_{\text{гл-гал}}$) от времени (τ) для процесса ферментативного гидролиза лактозы при соответствующих температурах

Как видно на рисунке, с увеличением температуры от 30 до 45 °С на начальных участках зависимостей наблюдается рост их крутизны, что свидетельствует о возрастании скорости ферментативного гидро-

лиза лактозы. Однако при дальнейшем повышении температуры процесса до 50 °С наблюдается некоторое снижение скорости гидролиза. Очевидно, при температурах свыше 45 °С начинаются структурные изменения в составе фермента β-галактозидазы препарата «Лактазар», что уменьшает каталитическую способность. Однако даже при 50 °С сохраняется высокая каталитическая активность, что свидетельствует о содержании в составе препарата «Лактазар» β-галактозидазы в основном внеклеточного типа [10].

В результате расчета кажущейся энергии активации с использованием линейных участков для зависимостей при температурах 30 и 50 °С (см. рис. 1) ее величина составила 11,8 кДж/моль. Полученное значение свидетельствует о низком активационном барьере рассматриваемой ферментативной реакции гидролиза.

Таким образом, с точки зрения полноты процесса гидролиза лактозы молочной сыворотки и скорости протекания целесообразно использовать повышенные температуры вплоть до 45 °С.

Проведено исследование влияние соотношения массы введенного препарата «Лактазар» к объему сыворотки. Эксперименты проводились в термостатированной качалке при перемешивании. Использовали постоянный объем сыворотки 100 мл, варьировали количество введенного препарата. Продолжительность каждого опыта составляла 4 ч. Результаты представлены на рис. 2.

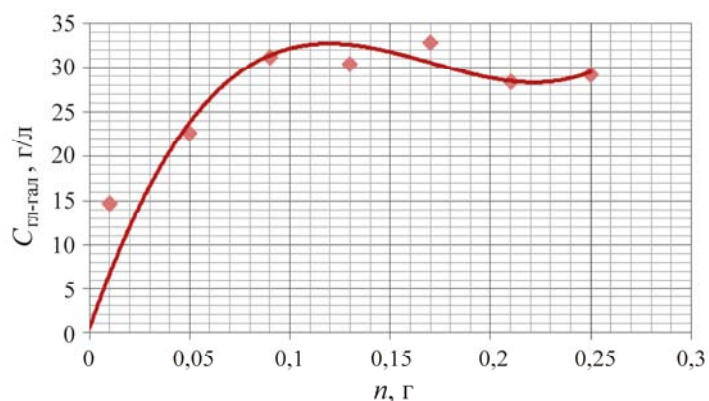


Рис. 2. Зависимость суммарной концентрации глюкозы и галактозы ($C_{\text{гл-гал}}$) в растворе сыворотки от количества добавленного препарата «Лактазар» (n)

На рис. 2 видно, что с увеличением массы введенного препарата «Лактазар» (количества β-галактозидазы) растет полнота процесса

гидролиза. Для массы введенного препарата $\approx 0,1$ г на 100 мл сыворотки суммарная концентрация моносахаров стабилизируется. Это свидетельствует о том, что данное соотношение биокатализатор–сыворотка является достаточным для реализации высокой степени превращения лактозы с учетом ее исходного содержания в сыворотке.

С целью подтверждения полученных данных и для выявления оптимальных условий процесса ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки выполнен временной эксперимент. Условия его проведения были следующими. Отбирали 500 мл сыворотки, ставили в термостатируемую качалку со скоростью вращения 100 об/мин и нагревали до температуры 45 °С. После этого вводили содержимое одной капсулы препарата «Лактазар» ($\approx 0,55$ г). Через определенные промежутки времени осуществляли отбор проб и в них определяли суммарную концентрацию моносахаров. Результаты определения их концентрации представлены на рис. 3.

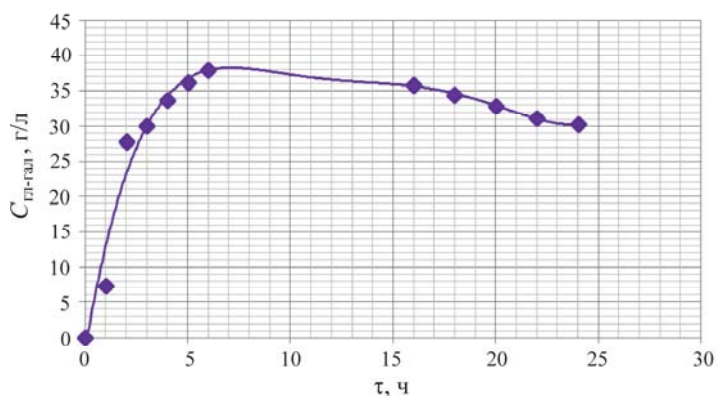


Рис. 3. Зависимость суммарной концентрации глюкозы и галактозы ($C_{\text{гл-гал}}$) в растворе сыворотки от времени (τ) ферментативного гидролиза

Как следует из рис. 3, первоначально (в течение первых 3 ч) скорость накопления моносахаров максимальна. Затем она замедляется и для времени гидролиза 6 ч достигает максимума. При этом степень превращения лактозы в глюкозу и галактозу достигает ≈ 90 %. Некоторое снижение содержания моносахаров к периоду времени 16–24 ч гидролиза можно объяснить их потреблением в результате роста микроорганизмов, присутствующих в исходной сыворотке.

Таким образом, выполненное исследование подтвердило целесообразность использования для ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки β -галактозидазы грибкового происхождения. Ус-

тановлена оптимальная температура осуществления процесса гидролиза – 45 °С. Для температурного интервала 30–50 °С определена кажущаяся энергия активации ферментативного гидролиза лактозы, равная 11,8 кДж/моль. Установлено, что добавление ≈0,1 мас. % препарата β-галактозидаза «Лактазар» достаточно для обеспечения 90 % степени превращения лактозы сыворотки с исходным содержанием 36,4–42,2 г/л в моносахара при температуре 45 °С. При этом период времени для достижения указанной степени превращения составил ≈6 ч.

Список литературы

1. Храмов А.Г. Молочная сыворотка. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
2. Храмов А.Г. Феномен молочной сыворотки. – СПб.: Профессия, 2011. – 804 с.
3. Кунижев С.М., Шуваев В.А. Новые технологии в производстве молочных продуктов. – М.: ДеЛи принт, 2004. – 203 с.
4. Храмов А.Г., Василисин С.В. Промышленная переработка вторичного молочного сырья. – М.: ДеЛи принт, 2003. – 100 с.
5. Майоров А.А., Сурай Н.М., Бузоверов С.Ю. Обоснование мембранных методов разделения молочной сыворотки // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та. – 2012. – № 5. – С. 104–107.
6. Залашко М.В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. – М.: Агропромиздат, 1990. – 192 с.
7. Мяло С.В., Гаврилова Н.Б., Воронова Т.Д. Исследование процесса гидролиза молочного сахара энзиматическим и микробиологическим способами // Ползуновский альманах. – 2005. – № 1. – С. 87–94.
8. Эффективность применения β-галактозидазы для гидролиза лактозы молочной сыворотки / Е.В. Скворцов, Ю.А. Морозова, Л.К. Букуру [и др.] // Вестник Казанского технол. ун-та. – 2014. – Т. 17, № 13. – С. 288–291.
9. Эффективность применения β-галактозидазы для получения низколактозного напитка на основе молочной сыворотки / Л.К. Букуру, Е.В. Скворцов, Т.В. Багаева, З.А. Канарская // Вестник Казанского технол. ун-та. – 2017. – Т. 20, № 13. – С. 117–119.
10. Костеневич А.А., Сапунова Л.И. Бактериальные β-галактозидазы: биохимическое и генетическое разнообразие // Труды БГУ. – 2013. – Т. 8, ч. 1. – С. 52–63.
11. Крупин А.В., Козлова О.В., Солдатова Л.С. Изучение основных параметров гидролиза лактозы ферментными препаратами // Достижения науки и техники АПК. – 2009. – № 5. – С. 68–69.
12. Практикум по микробиологии: учеб. пособие / под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

13. Nickerson T.A., Vujilic I.F., Lin A.Y. Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products // *J. of dairy science*. – 1975. – Vol. 59, № 3. – P. 386–390.

14. Афанасьев Б.Н., Акулова Ю.П. Физическая химия: учеб. пособие. – СПб.: Лань, 2012. – 464 с.

References

1. Hramtsov A.G. Molochnaya syvorotka [Whey]. Moscow, 1990. 240 p.
2. Hramtsov A.G. Fenomen molochnoy syvorotki [Whey phenomenon]. St. Petersburg, 2011. 804 p.

3. Kunizhev S.M., Shuvayev V.A. Novyye tekhnologii v proizvodstve molochnykh produktov [New technologies in the production of dairy products]. Moscow, 2004. 203 p.

4. Hramtsov A.G., Vasilisin S.V. Promyshlennaya pererabotka vtorichnogo molochnogo syr'ya [Industrial processing of secondary dairy raw materials]. Moscow, 2003. 100 p.

5. Mayorov A.A., Suray N.M., Buzoverov S.Yu. Obosnovaniye membrannykh metodov razdeleniya molochnoy syvorotki [Substantiation of membrane methods for separation of whey]. *Vestnik Altayskogo gosud. agrarnogo un-ta*, 2012, no. 5. pp. 104-107.

6. Zalashko M.V. Biotekhnologiya pererabotki molochnoy syvorotki [Whey processing biotechnology]. Moscow, 1990. 192 p.

7. Myalo S.V., Gavrilova N.B., Voronova T.D. Issledovaniye protsessa gidroliza molochnogo sakhara enzimaticheskim i mikrobiologicheskimi sposobami [Investigation of the process of hydrolysis of milk sugar by enzymatic and microbiological methods]. *Polzovnovskiy al'manakh*, 2005, no. 1, pp. 87-94.

8. Skvortsov Ye.V., Morozova Yu.A., Bukuru L.K. i dr. Effektivnost' primeniya b-galaktozidazy dlya gidroliza laktozy molochnoy syvorotki [Efficiency of using β -galactosidase for hydrolysis of lactose in whey]. *Vestnik Kazanskogo tekhnol. un-ta*, 2014, vol. 17, no. 13, pp. 288-291.

9. Bukuru L.K., Skvortsov Ye.V., Bagayeva T.V., Kanarskaya Z.A. Effektivnost' primeniya b-galaktozidazy dlya polucheniya nizkolaktoznogo napitka na osnove molochnoy syvorotki [The effectiveness of the use of β -galactosidase to obtain a low-lactose drink based on whey]. *Vestnik Kazanskogo tekhnol. un-ta*, 2017, vol. 20, no. 13, pp. 117-119.

10. Kostenevich A.A., Sapunova L.I. Bakterial'nyye b-galaktozidazy: biokhimi-cheskoye i geneticheskoye raznoobraziye [Bacterial β -galactosidases: biochemical and genetic diversity]. *Trudy BGU*, 2013, vol. 8, no. 1, pp. 52-63.

11. Krupin A.V., Kozlova O.V., Soldatova L.S. Izucheniye osnovnykh parametrov gidroliza laktozy fermentnymi preparatami [The study of the main parameters of lactose hydrolysis by enzyme preparations]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2009, no. 5, pp. 68-69.

12. Netrusov A.I., Yegorova M.A. and Zakharchuk L.M. Praktikum po mikrobiologii [Microbiology workshop]. Moscow, 2005. 608 p.

13. Nickerson T.A., Vujilic I.F., Lin A.Y. Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J. of dairy science*, 1975, vol. 59, no. 3, pp. 386-390.

14. Afanas'yev B.N., Akulova Yu.P. Fizicheskaya khimiya [Physical chemistry]. St. Petersburg, 2012. 464 p.

Получено 05.11.2019

Об авторах

Ходяшев Николай Борисович (Пермь, Россия) – доктор технических наук, заведующий кафедрой химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: vvv@pstu.ru).

Вихарева Елизавета Андреевна (Пермь, Россия) – магистрант кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: elizaveta.vihareva@mail.ru).

Ратников Егор Александрович (Пермь, Россия) – студент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29; e-mail: ratnikov.egor@59.ru).

About the authors

Nikolay B. Hodyashev (Perm, Russian Federation) – Doctor of Technical Sciences, Head of Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990; e-mail: vvv@pstu.ru).

Elisaveta A. Vihareva (Perm, Russian Federation) – Undergraduate Student, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990; e-mail: elizaveta.vihareva@mail.ru).

Egor A. Ratnikov (Perm, Russian Federation) – Student, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990; e-mail: ratnikov.egor@59.ru).