

**Вікторія ГНІЦЕВИЧ,
Надія ЧИКУН,
Юлія ГОНЧАР**

КІНЕТИКА ФЕРМЕНТОЛІЗУ ЛАКТОЗИ МОЛОЧНОЇ СИРОВАТКИ

Для вирішення проблеми створення низьколактозних харчових продуктів удосконалено технологію видалення лактози з молочної сироватки. Досліджено вплив температури, часу, рН середовища, наявності активаторів на процес ферментативного гідролізу лактози молочної сироватки. Доведено, що раціональними умовами процесу є $t=50^{\circ}\text{C}$, рН 5–5.5, а введення 2%-го розчину CaCO_3 сприяє активізації ферментолізу лактози.

Ключові слова: підсирна сироватка, температура, рН, фермент мікробного походження, лактоза.

Гнищевич В., Чикун Н., Гончар Ю. Кинетика ферментализа лактозы молочной сыворотки. Для решения проблемы создания низьколактозных пищевых продуктов усовершенствована технология удаления лактозы из молочной сыворотки. Исследовано влияние температуры, времени, рН среды, наличия активаторов на процесс ферментативного гидролиза лактозы молочной сыворотки. Доказано, что рациональными условиями процесса является $t=50^{\circ}\text{C}$, рН 5–5.5, а введение 2%-го раствора CaCO_3 способствует активизации ферментализа лактозы.

Ключевые слова: подсырная сыворотка, температура, рН, фермент микробного происхождения, лактоза.

Постановка проблеми. Сьогодні в усьому світі продовжує зростати інтерес до вторинної молочної сировини. Передусім це стосується технологій глибокої переробки молочної сироватки – цінного продукту переробки молока, що утворюється при виробництві твердого та кисломолочного сиру, казеїну. Із молочною сироваткою втрачається до 30 % білків молока, а також майже 95 % високоякісного молочного цукру лактози. Понад 54 % обсягу виробництва натуральної сироватки – це підсирна (солodka) сироватка. Друге місце належить сироватці, отриманій від виробництва кисломолочного сиру, і не більше 1 % становить казеїнова сироватка [1; 2].

На сьогодні в Україні обсяги сироватки всіх видів становлять майже 200 т/рік. Більше половини її ресурсів – 59 % – продають підприємствам агропромислового комплексу як корм для худоби, понад 20 % – зливають в каналізаційні системи, приблизно 25 % – відправляють на подальшу переробку з метою отримання продуктів

для експорту [3]. Щороку в Євросоюзі молочна промисловість виробляє 75 млн т сироватки, майже 40 % обсягу утилізується. Для вирішення проблеми збуту сироватки як побічного продукту молочної галузі Європейською асоціацією сироваткових продуктів (EWPA) прийнято Спеціальну програму [4].

Саме тому переробка вторинної молочної сировини, зокрема сироватки, є актуальним завданням. Дослідження в цьому напрямі перспективні – їх успішне завершення уможливить розробити низку нових ефективних технологій.

Основними напрямками промислової переробки молочної сироватки й використання її в ЄС, США та Україні є виробництво: молочного цукру-сирцю, сироватки згущеної без цукру, сироватки згущеної із цукром, сухої молочної сироватки, модифікованих продуктів із молочної сироватки – демінералізованої сироватки, зі зниженим вмістом лактози та концентрату сироваткових білків [1; 3; 5]. Розроблено низку технологій напівфабрикатів і кулінарної продукції для підприємств ресторанного бізнесу [6; 7].

Переробка молочної сироватки, незважаючи на численні розробки в цій сфері, стримується з багатьох причин – висока швидкість псування, низька стійкість вироблених продуктів, непереносимість людьми з низькою лактозною активністю продуктів на основі молочної сироватки, віддаленість місць отримання сировини від місць збуту цієї продукції, труднощі, пов'язані з її транспортуванням, незначні інвестиції в молочну промисловість, відсутність коштів на впровадження сучасних технологій і закупівлю обладнання, м'який контроль екологічної служби щодо фактів скидання сироватки в стічні води.

Вирішення проблеми непереносимості лактози є найбільш складним і можливе декількома шляхами. Згідно з визначенням, наведеним у Кодексі Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів США (FDA), "сироватка зі зниженим вмістом лактози – це речовина, яку отримують шляхом видалення лактози з сироватки". Найбільш поширеними методами видалення лактози є фізичні методи (осадження, фільтрація, або діаліз) [5]. Серед біологічних методів переробки сироватки переважає ферментативний гідроліз лактози до глюкози і галактози з отриманням продуктів зі зниженим вмістом молочного цукру. Цей метод знайшов широке промислове застосування в різних галузях виробництва в США, Франції, Фінляндії, Австралії [4; 5].

Одним із перспективних напрямів, які розширюють сферу застосування сироватки, є отримання низьколактозних продуктів при використанні ферментних препаратів направленої дії, зокрема на основі пропіоновокислих бактерій роду *Propioni bacterium freudenreichii* підвиду *shermanii*. Унаслідок процесу ферментування сироватка в значній мірі збагачується цінними продуктами метаболізму: вітамі-

нами групи В, органічними кислотами, ферментами, імунними тілами та іншими біологічно активними речовинами [6].

Над питанням культивування бактерій роду *Propioni bacterium freudenreichii* підвиду *shermanii* в поживному середовищі молочної сировини працювали науковці Л. І. Воробйова, А. С. Погосян, Є. П. Рижкова, І. С. Хамагаєва, Л. М. Качаніна, G. Jan та інші [8–12]. Результатом діяльності вітчизняних учених стало розроблення низки технологій кисломолочних продуктів і напоїв для дитячого та дієтичного харчування шляхом культивування виключно пропіоновокислих бактерій або з додаванням молочнокислих, оцтовокислих бактерій і стрептококів. У своїх дослідженнях науковці надавали увагу оптимальним умовам розвитку бактерій, їх колонієутворювальній здатності й культивуванню в шлунково-кишковому тракті людини та ступеню симбіотичної дії. Над питанням інтенсифікації накопичення вітаміну В₁₂ бактеріями роду *Propioni bacterium freudenreichii* підвиду *shermanii*, оброблених ультразвуком, працювали Б. С. Шершенков [13]. Водночас без уваги залишилося питання гідролізу лактози з утворенням низьколактозних або безлактозних продуктів переробки молочної сировини, зокрема на основі сироватки.

Мета роботи – дослідження впливу температури, рН середовища, концентрації внесеного ферментного препарату та часу на вміст лактози в молочної сироватці.

Матеріали та методи. Предмет дослідження – підсирна сепарована сироватка фермерського господарства. Ферментний препарат направленої дії "ЧізПроПропіоні" (Італія).

Вміст лактози визначено рефрактометричним методом, заснованим на вимірюванні показника заломлення прозорих розчинів лактози, отриманих при осадженні молочних білків і жирів розчином хлориду кальцію та при центрифугуванні [14]. Показник заломлення складається з показників заломлення води (1.3330) та складових частин знежиреної молочної сироватки – лактози, сироваткових білків, солей та інших компонентів. Молочний жир перебуває у стані емульсії й на показник заломлення не впливає. Умовно приймають, що частка показника заломлення, яка припадає на мінеральні солі та інші сполуки, – величина постійна, тому його зміни в молоці обумовлені наявністю білків і лактози. Звідси випливає, що у безбілкової сироватки цей показник обумовлюється лише масовою часткою лактози. Повторюваність дослідів і аналізів трикратна.

За сукупними даними дослідників різних наукових шкіл оптимальними в нормалізованому за вмістом жиру молоці визначено такі граничні умови активності бактерій роду *Propioni bacterium freudenreichii* підвиду *shermanii*: $t = 15\text{--}40\text{ }^\circ\text{C}$, рН 4.6–8.0 (оптимум відповідає показнику рН 6.5–7.0), $C = 0.3\text{ г на } 10\text{ л}$, $\tau = 24\text{--}48\text{ год}$ [11; 12]. Для дослідження результатів діяльності ферментного препарату "ЧізПро-

Пропіоні" на основі бактерій роду *Propionibacterium freudenreichii* підвиду *shermanii* запропоновані умови обрано як базові.

За рекомендаціями дослідників [6] найбільш сприятливим джерелом вуглеводів для синтезу є глюкоза, хоча бактерії добре ростуть на лактозі, лактаті, піруваті, гліцерині. Задля досягнення цілі – зменшення вмісту лактози – додавання смако-ароматичних речовин на основі сахарози передбачається після завершення процесу ферментативного гідролізу лактози. Визначено, що ріст пропіоновокислих бактерій в молочній сироватці активізується при додаванні до неї 2 % карбонату кальцію. Для підтвердження цієї залежності проведено паралельні досліди з внесенням розчину карбонату кальцію до досліджуваних зразків молочної сироватки та без нього.

Із метою регулювання рН середовища використано 2 н розчин NH_4OH , для підтримання незмінних температурних параметрів (15, 40 і 50°C) ферментування досліджуваних зразків проведено в термостатах лабораторних сухоповітряних ТВ-80. Для побудови тренду розвитку, піку діяльності та завершення процесу ферментативного гідролізу лактози молочної сироватки вимірювання результатів проведено через кожну годину протягом 22 годин.

Результати досліджень. Установлено, що початковий вміст лактози в молочній сироватці сепарованій становить – 5.7 %.

Експериментальні дослідження проведено в кілька етапів. На першому етапі досліджено вплив рН середовища на перебіг процесу ферментолізу за незмінної $t=50^\circ\text{C}$ (рис. 1).

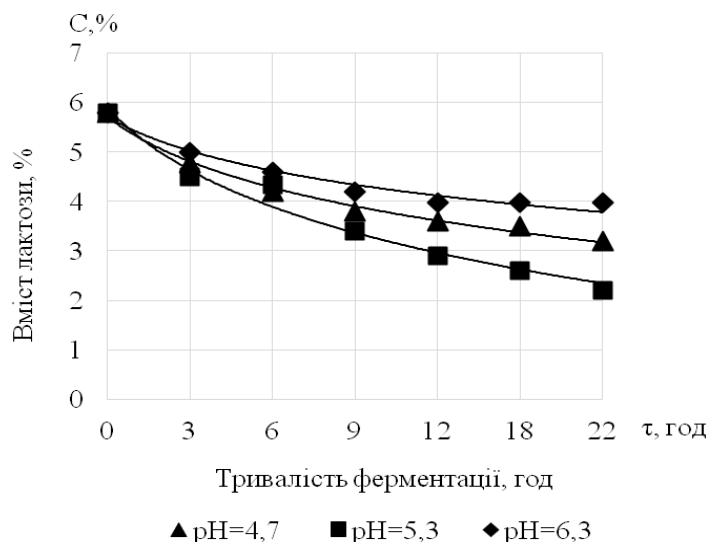


Рис. 1. Вплив рН середовища на вміст лактози

Установлено, що змінення значень рН середовища в рекомендованих межах рН 4.6–6.5 впливає на активність роботи ферментів. Підвищення значень рН середовища з 4.7 до 5.3 приводить до акти-

вації ферментолізу, водночас вміст лактози зменшується з 5.7 до 2.4 %. Подальше підвищення рН до 6.3 незначно активізує процес. Для всіх дослідів процес стабілізується на 12-й годині. Отже, для подальших досліджень використано рН 5.3.

На наступному етапі досліджено вплив температури в інтервалі 15–50 °С на кінетику ферментолізу лактози за незмінного значення рН 5.3 (рис. 2).

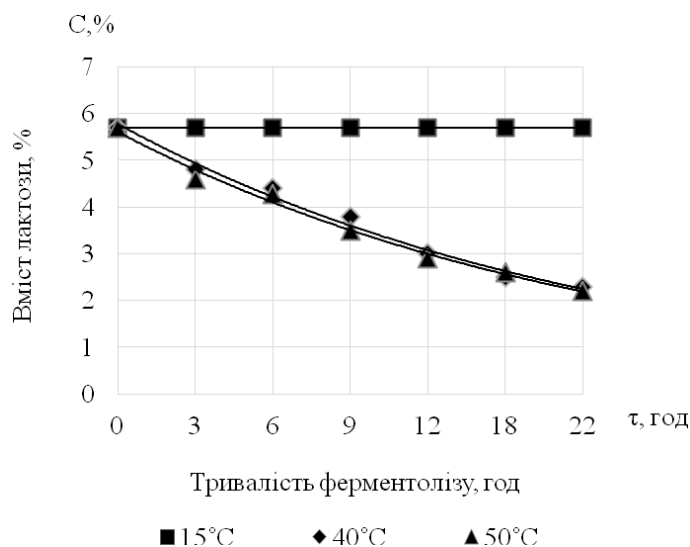


Рис. 2. Вплив температури на вміст лактози

У результаті проведення досліджень за $t = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 22 годин встановлено, що за таких умов ферментативний гідроліз не починається. У досліджуваних зразках за $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ процес ферментування молочної сироватки відбувається однаково активно. Водночас за $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ досліджувані зразки мають неприємний сивушний запах, що не може бути прийнятним для виробництва харчової продукції на основі безлактозної сироватки через свої незадовільні органолептичні властивості. Характерний сивушний запах продукту надають вищі спирти, що утворюються унаслідок спиртового бродіння за $t = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$. За $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ дослідні зразки мали приємний молочно-горіховий аромат.

Як було зазначено, процес пропіоновокислого бродіння протікає більш інтенсивно за наявності каталізуючих речовин. У зв'язку з цим досліджено процес ферментолізу лактози в присутності 2 %-го розчину CaCO_3 в кількості 0.001 % за незмінних $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ та рН 5.3. Як контроль обрано сироватку без каталізатора (рис. 3).

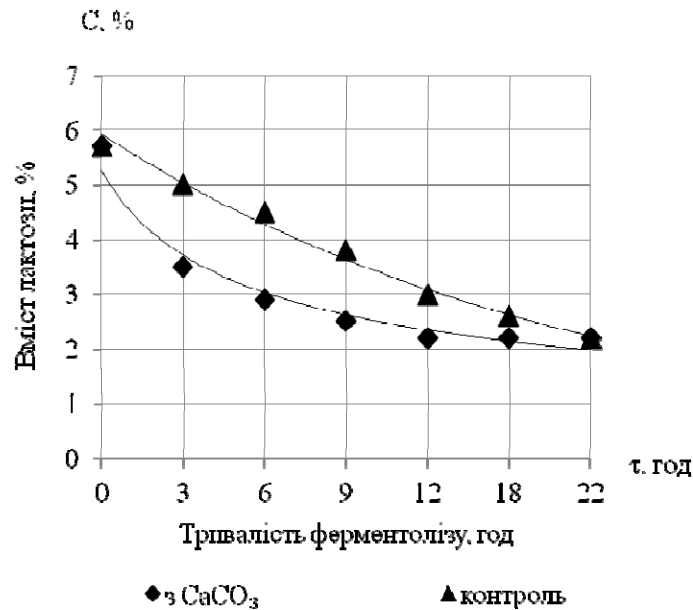


Рис. 3. Вплив CaCO₃ на вміст лактози, %

Установлено, що внесення 2%-го розчину CaCO₃ активізувало початок ферментативного гідролізу, процес прискорився майже вдвічі. Активізуюча дія розчину CaCO₃ заснована на тому, що він відновлює дисульфідні зв'язки ферменту в сульфгідрильні, необхідні для прояву ферментом своєї каталітичної активності. За такої умови сам активатор окислюється за рахунок перетворення сульфгідрильних зв'язків у дисульфідні. Процес стабілізувався на 8–9-й годині, а контроль, як і в попередніх випадках, – на 12-й годині. За подальших випробувань для всіх зразків вміст лактози залишався на рівні 2.0–2.2 %.

Висновки. На основі проведених експериментальних досліджень визначено, що за $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5–5.5, наявності 2%-го розчину CaCO₃ масова частка лактози зменшується з 5.7 до 2–2.2 %. Установлено, що за обраних технологічних параметрів досягнення максимального ефекту відбувається вже через 9 годин і вміст лактози залишається незмінним в досліджуваному продукті, що робить недоцільним проведення тривалішого процесу ферментолізу. Отримані дані використовуватимуться для оптимізації процесу ферментолізу лактози.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ДСТУ 7515:2014. Сироватка молочна. Технічні умови. Київ : Держспоживстандарт України. 2013. 14 с.
2. Якубчак О. М. Ветеринарно-санітарна експертиза з основами технології і стандартизації продуктів тваринництва. Київ : Біопром, 2005. 800 с.
3. Маркетинговое исследование украинского рынка молочной сыворотки. Alliance Capital Management. М. : Эксмо, 2016. 220 с.

4. *Final Report Summary* – WHETLAC (Transformation of the residual whey permeate from the cheese manufacture: lactic acid production). Project ID: 222400. Funded under: FP7-SME. Country: Spain. URL : <http://www.WHETLAC.cartif.com.es>.
5. *Electronic code of federal regulations*. Quality Specifications for Raw Material [e-CFR]. 10.10.1975. USA. 2017. §§ 58.711. 58.722.
6. *Воробйова Л. И.* Пропионовокислые бактерии : монография. М. : Изд-во МГУ, 1995. 288 с.
7. *Юдіна Т. І.* Визначення показників безпеки молочно-білкових напівфабрикатів зі сколотин. Обладнання та технології харчових виробництв : темат. зб. наук. праць. Донецьк : ДонНУЕТ, 2014. Вип. 32. С. 225—232.
8. *Погосян А. С.* Разработка технологии низколактозных молочных продуктов с использованием ферментных препаратов бета-галактозидазы : дис. ... канд. техн. наук : 05.18.04. Одесса, 2007. 214 с.
9. *Рыжкова Е. П.* Предпосылки для испытаний штамма *Propioni bacterium freudenreichii RVS-4-irf* в качестве компонента клинического питания. Биотехнология. 2015. № 4. С. 70—78.
10. *Гніцевич В. А.* Аналіз і перспективи використання білково-вуглеводної молочної сировини в Україні. Матеріали міжнар. наук.-практ. конф. "Глобалізаційні виклики розвитку національних економік". Т. 3. Київ : Київ. нац. торг.-екон. ун-т, 2016. С. 673—684.
11. *Хамагаева И. С., Качанина Л. М., Тумурова С. М.* Биотехнология заквасок пропионовокислых бактерий : монография. Улан-Удэ : Изд-во ВСГТУ, 2006. 172 с.
12. *Jan G.* Survival and beneficial effects of propionibacteria in human gut: in vivo and in vitro investigations. Lait. 2002. Vol. 82, N 1. P. 131—144.
13. *Шершенков Б. С.* Разработка технологии ферментированных молочных продуктов с применением ультразвуковой интенсификации биотехнологических процессов : дис. канд. техн. наук : 05.18.07. СПб. 2015. 140 с.
14. *Инихов Г. С.* Методы анализа молока и молочных продуктов. М. : Книга по требованию, 2012. 424 с.

Стаття надійшла до редакції 25.09.2017.

Gnitsevych V., Chykun N., Honchar Y. Kinetics of fermentation of lactose whey.

Background. Production volumes of whey and all kinds of raw material sources in Ukraine constitute about 200 tons per year now. In the European Union each year milk industry produces 75 million tons of whey, about 40 % of the amount of whey is utilized. One promising direction that extends the use of whey is getting low-lactose products resulting from the use of enzymes of directed action, including based on propionic acid bacteria of the genus *Propionibacterium freudenreichii* subspecies *shermanii*.

The aim of the study is to research of the effect of the temperature, pH environment, concentration of the added ferment and the time on the lactose content in the milk whey.

Material and methods. The content of lactose was determined by refractometric method [14]. Repetition of experiments and analyzes is threefold.

Results. The influence of temperature, pH of the medium, concentration of the introduced enzyme preparation on the change of lactose content in milk whey was studied. To construct a trend for the development of fermentative hydrolysis of lactose in

milk whey, measurement of the results was carried out at regular intervals of 22 hours. The recommendations for the cultivation of bacteria of the genus *Propionibacterium freudenreichii* subspecies *shermanii* were summarized, and the boundary conditions of the enzyme activity on their basis were determined. According to the recommended concentrations of the enzyme preparation in the investigated milk whey, temperature regimen, pH value of the medium and the presence of activators, rational technological regimes of fermentolysis have been substantiated.

Conclusion. It was found that at $t = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 5–5.5, the presence of 2 % CaCO_3 solution, the mass fraction of lactose decreases from 5.7 to 2–2.2 %. and achievement of maximum effect for the chosen technological parameters occurs after 12 hours. The obtained data will be used to optimize the lactose fermentolysis process.

Keywords: cheese whey, temperature, pH, enzyme, fermentolysis, lactose.

REFERENCES

1. DSTU 7515:2014. Syrovatka molochna. Tehnichni umovy. Kyi'v : Derzhspozhyvstandart Ukrainy. 2013. 14 s.
2. *Jakubchak O. M.* Veterynarno-sanitarna ekspertyza z osnovamy tehnologii' i standartyzatsii' produktiv tvarynnyctva. Kyi'v : Bioprom, 2005. 800 s.
3. *Marketynghovoe yssledovanye ukraynskogo ryynka molochnoj syvvorotky.* Alliance Capital Management. M. : Эkсмо, 2016. 220 s.
4. *Final Report Summary – WHETLAC (Transformation of the residual whey permeate from the cheese manufacture: lactic acid production).* Project ID: 222400. Funded under: FP7-SME. Country: Spain. URL : <http://www.WHETLAC.cartif.com.es>.
5. *Electronic code of federal regulations. Quality Specifications for Raw Material [e-CFR].* 10.10.1975. USA. 2017. §§ 58.711. 58.722.
6. *Vorobjova L. Y.* Propyonovokyslyye bakteryy : monografyja. M. : Yzd-vo MGU, 1995. 288 s.
7. *Judina T. I.* Vyznachennja pokaznykiv bezpeky molochno-bilkovyh napiv-fabrykativ zi skolotyln. Obladnannja ta tehnologii' harchovyh vyrobnyctv : temat. zb. nauk. prac'. Donec'k : DonNUET, 2014. Vyp. 32. S. 225—232.
8. *Pogosjan A. S.* Razrobotka tehnologyy nyzkolaktoznyyh molochnyyh produktov s yspol'zovanyem fermentnyyh preparatov beta-galaktozydazy : dys. ... kand. tehn. nauk : 05.18.04. Odessa, 2007. 214 s.
9. *Ryzyhkova E. P.* Predposyylky dlja yspyytanyj shtamma *Propioni bacterium freudenreichii* RVS-4-irf v kachestve komponenta klynicheskogo pytanyja. *Byotehnologyja.* 2015. № 4. S. 70—78.
10. *Gnicevyeh V. A.* Analiz i perspektyvy vykorystannja bilkovo-vuglevodnoi' molochnoi' syrovyny v Ukraini. Materialy mizhnar. nauk.-prakt. konf. "Globalizacijni vyklyky rozvytku nacional'nyh ekonomik". T. 3. Kyi'v : Kyi'v. nac. torg.-ekon. un-t, 2016. S. 673—684.
11. *Hamagaeva Y. S., Kachanyna L. M., Tumurova S. M.* Byotehnologyja zakva-sok propyonovokyslyyh bakteryj : monografyja. Ulan-Ude : Yzd-vo VSGTU, 2006. 172 s.
12. *Jan G.* Survival and beneficial effects of propionibacteria in human gut: in vivo and in vitro investigations. *Lait.* 2002. Vol. 82, N 1. R. 131—144.
13. *Shershenkov B. S.* Razrobotka tehnologyy fermentyrovannyh molochnyyh produktov s pryomenenyem ul'trazvukovoj yntensyfykacyy byotehno-logycheskyh processov : dys. kand. tehn. nauk : 05.18.07. SPb. 2015. 140 s.
14. *Ynyhov G. S.* Metodyy analiza moloka y molochnyyh produktov. M. : Knyga po trebovanyju, 2012. 424 s.