

УДК 579.864+616-095+579.61:615.27

Н.В. Дехтяренко, О.М. Дуган

РОЗРОБЛЕННЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ НА ОСНОВІ ГІДРОЛІЗАТІВ СОЄВОГО БОРОШНА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ РОДУ *LACTOBACILLUS*

The paper considers the second stage of developing the laboratory technology of sanitary sour-milk products on the basis of the soybean flour. It was produced according to the novel national technology ECO[®]. The technology is based on the special processing of seeds soybean called "seeds awakening[®]". As a result of biochemical transformations of matters, outer and inner decontamination of weevils take place. We select concentrations, pH optimum of operating and time length of enzymatic processing of the soybean flour by ferment preparations of the alkaline protease and protease C aimed at subsequent usage as the basis for nutrient mediums. In addition, we detect the inductive influence of hydrolysates of the soybean flour on synthesis of exogenic proteins – metabolites by cultures of lactic acid bacteria *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LE and *L. rhamnosus* LB3 (IMB B-7038) has detected. The increase of protein concentration in the medium of cultivation of *L. rhamnosus* LB3 strain reaches 90 %. We also show adding 1 % of hydrolysates of the soybean flour of the glucose provides the maximum biosynthetic activity of cultures of the lactic acid bacteria.

Вступ

Фармакологічні препарати і біологічно активні харчові домішки, які містять молочнокислі бактерії (МКБ) родів *Lactobacillus* і *Bifidobacterium*, а також продукти їх життєдіяльності, в наш час все більше використовуються при корекції дисбіотичних станів відкритих порожнин організму людини, у т.ч. в умовах інтенсивного техногенного навантаження на екосистему [1]. При цьому один із традиційних способів виробництва пробіотичних препаратів полягає в культивуванні спеціально відібраних штамів лактобактерій і біфідобактерій на гідролізатно-молочному середовищі, яке готується на панкреатичному гідролізаті коров'ячого молока. В той же час існування осіб з непереносимістю молока і молочних продуктів значно звужує сферу використання таких препаратів, що робить актуальним пошук альтернативних трофічних субстратів для культивування МКБ [2].

Для нормального росту і розвитку МКБ, як правило, необхідні субстрати зі складними органічними формами азоту. На сьогодні для культивування лактобактерій використовують два види поживних середовищ на основі соєвого борошна: соєве молоко і гідролізат екстракту соєвого борошна [3, 4].

Гідроліз білків для мікробіологічних цілей зазвичай проводять за допомогою ферментів або хімічними методами. При хімічному гідролізі, крім білкових субстратів, можуть бути зруйновані вітаміни та інші компоненти. Ферментативний гідроліз білків краще зберігає лабільні амінокислоти та фактори росту [5]. Гідроліз проводять за допомогою препаратів протеїназ різного ступеня очистки: пепсину, препаратів підшлункової залози, папаїну, протеїназ мікробного походження.

Порівняно з гідролізатно-молочним поживним середовищем використання гідролізатно-соєвого середовища для культивування виробничих штамів родів *Bifidobacterium* і *Lactobacillus* прискорює темпи їх росту [4].

Перспективним для приготування соєвого молока є використання соєвого борошна, виготовленого згідно з новою національною технологією ECO[®] (виробник ТОВ "ЕСО") [6].

Постановка задачі

Метою роботи є вивчення можливості використання гідролізатно-соєвого середовища для виробництва продуктів функціонального харчування з поліпшеними оздоровчими та органолептичними показниками на основі лактобактерій та соєвого борошна, виготовленого згідно з новою національною технологією ECO[®].

Матеріали і методи експериментальних досліджень

У роботі використовували культури молочнокислих бактерій – представників роду *Lactobacillus* Weijerinck (1901) з музею культур мікроорганізмів кафедри промислової біотехнології факультету біотехнології і біотехніки НТУУ "КПІ" – *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LE і *L. rhamnosus* LB3 (IMB B-7038).

Культури зберігалися при температурі 4 °С в пробірках у товщі напіврідкого (0,2 % агар-агару) середовища MRS (середовище *de Man, Rogosa, Sharpe*, 1960) [7], розлитого в кількості 8 см³. Частота пересівів – один раз на місяць.

Культивування лактобактерій проводили при 38 ± 1 °С на гідролізатах соєвого борошна. Поживні середовища стерилізували при 0,5 МПа протягом 20 хв.

Підбір способу приготування ферментативних гідролізатів соєвого борошна здійснювали на першому етапі дослідження. Використовували соєве борошно, виготовлене згідно з технологією ЕСО® (виробник ТОВ “ЕСО”). Ця технологія полягає в особливій переробці насіння сої, названій “пробудженням насіння®”. В результаті пробудження насіння відбуваються біохімічні перетворення речовин, зовнішнє і внутрішнє знезараження зернівок.

Використовували три види соєвого борошна: соя ЕСО “Подарунок сонця” (Супер), соя ЕСО пробуджена, помел 0,8 (дрібнодисперсний), соя ЕСО пробуджена, помел 1,0 (звичайний).

Спочатку готували соєве молоко згідно з таким способом [6, 8]: змішували соєве борошно з водою при масовому співвідношенні борошно:вода = 1:20; ретельно перемішували суспензію; нагрівали суспензію до температури кипіння і витримували 10 хв; охолоджували екстракт до кімнатної температури; фільтрували екстракт через тканинний фільтр; гомогенізували соєве молоко в гомогенізаторі марки MPW-309 протягом 15 хв.

Як гідролізуючі ферменти використовували лужну протеазу (активність 49013 од./г) і протеазу С (активність 15350 од./г). Виробник ферментних препаратів – Ладижинський завод біо- і ферментних препаратів (Україна, Вінницька обл., м. Ладижин).

Після приготування соєвого молока встановлювали значення рН, оптимальне для дії кожного ферменту: для лужної протеази рН 8,5 або 9,5; для протеази С – рН 7,0 або 10,5. Потім ферментні препарати додавали в екстракти з розрахунку 2 і 6 % від маси соєвого борошна. Для консервації в гідролізат додавали хлороформ у концентрації 10 см³/л. Витримували при 40±0,25 °С протягом 21 год, регулярно перемішували. Внаслідок зниження значення рН у процесі гідролізу проводили його коригування.

рН середовищ вимірювали за допомогою рН-метра марки рН-150МА. Кількість білка у ферментаційному середовищі та культуральній рідині визначали за методом Лоурі [9]. Вміст амінного азоту визначали методом формольного титрування [10].

Перед дослідженням зазначених вище показників культур лактобактерій проводили їх адаптацію, культивуючи на рідкому середовищі MRS [7] протягом доби. Чистоту культур лактобактерій перед засівом поживних середовищ перевіряли мікроскопіюванням. Посівний матеріал вносили в кількості 5 % від об’єму від-

повідного середовища. Потім культури вирощували протягом 24 год на різних варіантах гідролізатів соєвого борошна.

Активність кислотоутворення визначали титриметричним методом [7]. Вміст вуглеводів у середовищі визначали за кількістю редуруючих речовин методом Антрона. Пробірки з 4 см³ антронового реактиву ставили в ємність із проточною холодною водою і додавали в них 2 см³ досліджуваного розчину. Залишали на 14 хв на бані з гарячою водою (90 °С), охолоджували, колориметрували при 620 нм. Вміст вуглеводів розраховували за калібрувальним графіком [10].

Всі досліди ставили тричі. Розраховували середнє арифметичне значення, середнє квадратичне відхилення та стандартну похибку. В таблицях вказані середні арифметичні значення показників. Розрахунки проводили з використанням програми для роботи з електронними таблицями Microsoft Excel 2003.

Результати і їх обговорення

Підбір способу приготування гідролізатів соєвого борошна. З метою підбору стандартних умов проведення ферментативного гідролізу було визначено: значення рН реакційної суміші, тривалість процесу гідролізу, ступінь гідролізу субстрату за вмістом амінного азоту, концентрацією загального білка та концентрацією редуруючих речовин, вплив на ступінь гідролізу різних концентрацій ферментів у реакційній суміші.

Оскільки визначено [6], що з трьох типів соєвого борошна ТОВ “ЕСО” борошно типу ЕСО “Подарунок сонця” (“Супер”) забезпечує максимальний вміст азотистих речовин у соєвому молоці, то саме його і було вибрано для приготування гідролізатів.

Результати подані в табл. 1–3.

Аналіз даних табл. 1 показує, що концентрація амінного азоту при рН соєвого молока 8,5 на 21-шу год інкубації зростала в 2 рази порівняно з 5 год інкубації. В той же час при рН соєвого молока 9,5 вже на 5-й год інкубації концентрація амінного азоту досягала показників 21-ї год. Тобто рН 9,5 забезпечує більш повний гідроліз субстрату за менший проміжок часу.

Концентрація ферменту в реакційній суміші 6 % від маси соєвого борошна сприяла в 1,5 рази більшому вивільненню азотвмісних компонентів, ніж концентрація 2 %. Концентрація загального білка, корелюючи з концент-

Таблиця 1. Динаміка зміни концентрацій азотвмісних речовин у соєвому молоці при дії лужної протеази залежно від вихідного значення рН і концентрації ферменту

рН соєвого молока	8,5				9,5			
Концентрація ферменту, %	2	6	2	6	2	6	2	6
Тривалість гідролізу, год	Концентрація амінного азоту, мг/см ³		Концентрація білка, мг/см ³		Концентрація амінного азоту, мг/см ³		Концентрація білка, мг/см ³	
0	15,0	15,0	22,0	22,0	17,0	17,0	18,0	18,0
1,5	15,5	18,0	16,7	15,1	32,0	29,0	17,2	16,1
5	16,0	24,0	15,4	12,8	39,0	44,0	12,7	12,9
21	32,0	41,0	13,6	11,6	45,0	49,0	11,3	10,6

Таблиця 2. Динаміка зміни концентрацій азотвмісних речовин у соєвому молоці при дії протеази С залежно від вихідного значення рН і концентрації ферменту

рН соєвого молока	7,0				10,5			
Концентрація ферменту, %	2	6	2	6	2	6	2	6
Тривалість гідролізу, год	Концентрація амінного азоту, мг/см ³		Концентрація білка, мг/см ³		Концентрація амінного азоту, мг/см ³		Концентрація білка, мг/см ³	
0	15	15	22,0	22,0	18,0	18,0	17,0	17,0
1,5	23	22	21,5	18,5	33,0	30,0	15,3	16,8
5	36	34	17,6	12,6	41,0	47,0	14,5	9,1
21	41	44	14,14	11,8	44,0	50,0	12,7	8,7

Таблиця 3. Динаміка зміни концентрацій редуруючих речовин у соєвому молоці при дії лужної протеази та протеази С залежно від концентрацій ферментів

Фермент	Лужна протеаза				Протеаза С			
рН	9,5				10,5			
Концентрація ферменту, %	2	6	2	6	2	6	2	6
Тривалість гідролізу, год	Концентрація редуруючих речовин, мг/см ³		Відсоток збільшення концентрації редукуючих речовин		Концентрація редукуючих речовин, мг/см ³		Відсоток збільшення концентрації редукуючих речовин	
0	7,02							
1,5	7,22	7,24	2,8	3,0	7,08	7,68	0,8	8,6
5	8,00	9,00	12,3	22,0	7,98	8,70	12,0	19,3
21	8,40	10,2	16,4	31,2	8,58	9,54	18,2	26,4

рацією амінного азоту, теж мала інтенсивніше зниження при 6 %-ній концентрації лужної протеази.

Ферментний препарат протеаза С являє собою суміш двох лужних протеїназ, нейтральної протеїнази та двох пептидаз: аміно- і карбоксипептидази. Тому для досліду були вибрані нейтральне і лужне значення рН реакційної суміші. В результаті виявлено (табл. 2), що при рН 10,5 і концентрації ферменту 6 % спостерігаються всі перелічені вище для лужної протеази позитивні закономірності гідролізу.

Відомо, що при збільшенні дози ферментного препарату спостерігається інтенсивне на-

копичення редукуючих речовин, що призводить до закисання приготованого гідролізату. Зменшення дози зумовлює невиправдане збільшення тривалості процесу гідролізу і, як наслідок, призводить до значного подорожчання готових поживних середовищ.

Показано (табл. 3), що на 21-шу год гідролізу концентрація редукуючих речовин зростає на 6–14 % порівняно з 5-ю год. Оскільки виявлено, що вже на 5-ту год інкубації показники кількості азотвмісних речовин є достатніми, то має сенс зупинити гідроліз саме на 5-ту год, щоб запобігти закисанню приготованого гідролізату.

Аналізуючи вплив на ступінь гідролізу різних концентрацій ферментів у реакційній суміші, можна відзначити, що на 5-ту год інкубації 6 %-на концентрація ферментів збільшує кількість редуруючих речовин всього лише на 7,3–9,7 % порівняно з концентрацією 2 %. Таким чином, концентрація ферментів 6 % від маси соєвого борошна цілком забезпечує одержання якісного поживного середовища.

Отже, можна зробити висновок щодо оптимального способу одержання ферментних гідролізатів соєвого борошна: дозування ферментних препаратів 6 % від маси соєвого борошна, температура гідролізу $40 \pm 0,25$ °С, корекція рН у процесі гідролізу, тривалість гідролізу 5 год, що зрештою забезпечує високу швидкість гідролітичного розщеплення білка.

У табл. 4 наведено характеристики ферментативних гідролізатів соєвого борошна трьох

видів, які надалі будуть використані як поживні середовища, що містять доступні для продуцента джерела органічного азоту.

Зовнішній вигляд і колір ферментних гідролізатів можна охарактеризувати так: лужна протеаза утворює однорідну суспензію блідожовтого кольору, оптична густина якої перевищує одиницю; протеаза С розщеплює субстрат з утворенням однорідної прозорої жовтої рідини, тобто оптично прозорого середовища з оптичною густиною 0,1–0,2 од.

Концентрація амінного азоту в гідролізатах протеази С на 7, 10, 17 % вища, ніж у гідролізатах лужної протеази, тобто протеаза С забезпечує глибше розщеплення субстрату.

Біохімічні показники культур лактобактерій при вирощуванні на гідролізатах соєвого борошна. Нами показано, що соєве молоко індукує процеси біосинтезу метаболітів білкової

Таблиця 4. Характеристика ферментативних гідролізатів з різних видів соєвого борошна

Варіант поживного середовища	Фермент	Оптична густина	Концентрація амінного азоту, мг/см ³	Концентрація білка, мг/см ³
Гідролізат сої ЕСО "Подарунок сонця" ("Супер")	Лужна протеаза	1,156	44	12,9
	Протеаза С	0,200	47	9,1
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 0,8 (дрібнодисперсний)	Лужна протеаза	1,156	39	10,2
	Протеаза С	0,090	43	8,2
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 1,0 (звичайний)	Лужна протеаза	1,156	42	14,1
	Протеаза С	0,115	49	9,5

Таблиця 5. Біохімічні показники при вирощуванні культур лактобактерій на гідролізатах соєвого борошна різних видів

Варіант поживного середовища	Фермент	Вихідні показники поживного середовища		Характеристика поживного середовища після вирощування <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> LE				Характеристика поживного середовища після вирощування <i>L. rhamnosus</i> LB3			
		Концентрація білка, мг/см ³	рН	Концентрація білка, мг/см ³	Відсоток збільшення концентрації білка	рН	Відсоток зниження рН	Концентрація білка, мг/см ³	Відсоток збільшення концентрації білка	рН	Відсоток зниження рН
Гідролізат сої ЕСО "Подарунок сонця" ("Супер")	Лужна протеаза	12,9	9,5	13,6	5,4	8,2	13,7	24,7	91,5	6,3	33,4
	Протеаза С	9,1	7	9,6	5,5	6,1	13,2	17,4	91,2	4,6	33,8
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 0,8 (дрібнодисперсний)	Лужна протеаза	10,2	9,5	10,3	1,0	8,5	11,0	19,5	91,2	6,7	29,7
	Протеаза С	8,2	7	8,3	1,2	6,2	11,3	15,7	91,5	4,9	30,5
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 1,0 (звичайний)	Лужна протеаза	14,1	9,5	14,2	0,7	8,5	10,4	26,9	90,8	7,4	21,6
	Протеаза С	9,5	7	9,6	1,1	6,4	9,0	18,1	90,5	5,3	24,2

Таблиця 6. Значення рН поживних середовищ після ферментації лактобактерій

Варіант поживного середовища	Фермент	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> LE	<i>L. rhamnosus</i> LB3
Гідролізат сої ЕСО "Подарунок сонця" ("Супер")	Лужна протеаза	8,2	6,3
	Протеаза С	6,1	4,6
Гідролізат сої ЕСО "Подарунок сонця" ("Супер") + 1 % глюкози	Лужна протеаза	7,3	4,8
	Протеаза С	5,7	4,1
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 0,8 (дрібнодисперсний)	Лужна протеаза	8,5	6,7
	Протеаза С	6,2	4,9
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 0,8 (дрібнодисперсний) + 1 % глюкози	Лужна протеаза	6,8	4,8
	Протеаза С	5,4	4,0
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 1,0 (звичайний)	Лужна протеаза	8,5	7,4
	Протеаза С	6,4	5,3
Гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 1,0 (звичайний) + 1 % глюкози	Лужна протеаза	6,9	6,2
	Протеаза С	5,6	4,5

природи у штаму *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LE, а для штаму *L. rhamnosus* LB3 забезпечує високий рівень кислотоутворення при максимальному споживанні білкового субстрату [6]. З метою порівняння біохімічних показників вказаних штамів на гідролізатах соєвого борошна проводили аналіз ферментаційних середовищ на вміст білка і значення водневого показника до культивування штамів і на 24-ту год культивування (табл. 5).

Аналізуючи дані табл. 5, можна відзначити видоспецифічні особливості ферментації гідролігатів соєвого борошна культурами лактобактерій. Обидві культури синтезують екзогенні білки-метаболіти, але з різною інтенсивністю: збільшення концентрації білка в середовищі культивування штаму *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LE досягає 5 %, тоді як у штаму *L. rhamnosus* LB3 – аж 90 %, тобто в 18 разів більше. Рівень кислотоутворення в останнього у 2,5 разу вищий, ніж у штаму *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LE.

Показники ферментованих гідролігатів мало залежать від виду соєвого борошна і виду ферменту. В той же час можна відзначити індукційний вплив гідролізата сої ЕСО "Подарунок сонця" ("Супер") на накопичення білків-метаболітів штамом *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LE (в 5 разів інтенсивніше порівняно з іншими видами соєвого борошна) та кислотоутворюючу здатність штаму *L. rhamnosus* LB3 (в 1,5 разу інтенсивніше, ніж гідролізат сої ЕСО пробуджена, помел 1,0).

Вплив джерел вуглеводного живлення. У праці [6] показано, що для інтенсифікації біосинтетичних процесів лактобактеріями в соєве

молоко необхідно додавати глюкозу в кількості 1 %. Результати даної серії експериментів свідчать, що на 5-ту год гідролізу концентрація редуруючих речовин в соєвому молоці зростає з 7 до 9 мг/см³ (див. табл. 3). Отже, додаткове внесення 1 % глюкози в гідролізати має забезпечити концентрацію редууючих цукрів у середовищі в середньому 2 %, що відповідає їх вмісту в оптимальному для росту лактобактерій середовищі MRS [7]. Ми перевірили зміну показника рН середовища після культивування лактобактерій на гідролізатах соєвого борошна з та без додаткового внесення 1 % глюкози (табл. 6).

Наведені дані свідчать, що при додаванні в середовище 1 % глюкози ступінь зменшення рН середовищ більше, ніж без додавання: для штаму *L. delbrueckii* subsp. *lactis* LE на 7–20 %, для штаму *L. rhamnosus* LB3 – на 11–28 %. Таким чином, нами ще раз встановлена і підтверджена оптимальна концентрація вуглеводного субстрата в соєвому середовищі, що забезпечує максимальну біосинтетичну активність культур лактобактерій.

Висновки

1. Показано позитивний вплив ферментативної обробки на якість поживного середовища на основі соєвого борошна. Визначено оптимальну тривалість гідролізу – 5 год. Підібрано концентрації і рН-оптимиуми дії ферментів гідролізу: для лужної протеази 6 % при рН 9,5; для протеази С – 6 % при рН 10,5.

2. Охарактеризовано якість ферментних гідролігатів. Протеаза С як комплексний протеолі-

тичний ферментний препарат забезпечує глибше розщеплення субстрату з утворенням оптично прозорого середовища.

3. Виявлено індукційний вплив гідролізатів соєвого борошна на синтез екзогенних білків-метаболітів культурами лактобактерій. Збільшення концентрації білка в середовищі культивування штаму *L. rhamnosus* LB3 досягає 90 %.

4. Встановлено, що гідролізат сої *ЕСО* “Подарунок сонця” (“Супер”) збільшує біосинтез білків-метаболітів штамом *L. delbrueckii* subsp.

lactis LE і кислотоутворюючу здатність штаму *L. rhamnosus* LB3.

5. Показано, що додавання до гідролізатів соєвого борошна 1 % глюкози забезпечує максимальну біосинтетичну активність культур лактобактерій.

6. Наступним етапом досліджень стане порівняння біохімічних показників культур лактобактерій різних видів, вирощених на соєвому молотці і його гідролізатах з метою визначення оптимальних середовищ для кожного виду культур.

1. Дехтяренко Н.В. Особливості відбору пробіотичних культур роду *Lactobacillus* для створення препаратів і продуктів різного призначення: Дис. ... канд. сільгосп. наук: 03.00.20. – К., 2009. – 210 с.
2. Цинберг М.Б., Дерябин Д.Г., Денисова И.В. Ростовые и морфологические характеристики производственных штаммов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* при использовании гидролизатно-молочной и гидролизатно-соевой сред // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – 48, № 12. – С. 9–13.
3. Патент 444117 Україна, МПК А23С11/10. Спосіб одержання соєвого кисломолочного продукту / Силенко Г.П., Капрельянц Л.В., Шестобітов В.В.; ЗАТ НВО “Одеський біотехнологічний інститут”. – № 2001053061; заявл. 04.05.01; опубл. 15.01.02, Бюл. № 1.
4. Цинберг М.Б., Дерябин Д.Г., Денисова И.В. Гигиеническая характеристика препаратов молочнокислых бактерий, полученных с использованием гидролизатов молочного и соевого сырья // Гигиена и санитария. – 2002. – № 5. – С. 54–56.
5. Тодосійчук Т.С. Розробка технології гідролітичного ферментного препарату циторецифен: Автореф. дис. ... канд. техн. наук. – К., 2000. – 20 с.
6. Дехтяренко Н.В., Дуган О.М. Особливості приготування і ферментація соєвого молока представниками роду *Lactobacillus* // Наукові вісті НТУУ “КПІ”. – 2011. – № 3. – С. 34–39.
7. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. – М.: Наука, 1975. – 389 с.
8. Патент 47530 Україна, МПК А23С11/10, А23Л1/201, А23Л1/14. Спосіб одержання соєвого молока / Цигульов О.В. – № 2000020715; заявл. 09.02.00; опубл. 15.07.02, Бюл. № 7.
9. Практикум по биохимии: Учеб. пособие / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
10. Кусеренко Н.Е., Бабенюк Ю.Д., Васильев А.Н. Биохимия: Практикум. – К.: Выща школа, 1988. – 128 с.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
1 лютого 2012 року