

УДК 675.03.031.81:577.15

Зав. кафедрой А.Н.Пономарёв

(Воронеж. гос. ун-т. инж. технол.) кафедра производства продуктов животного происхождения.
тел. (473) 255-37-51

доцент Г.П. Шуваева

(Воронеж. гос. ун-т. инж. технол.) кафедра биохимии и биотехнологии.

тел. (473) 255-55-57

E-mail: gpshuv@mail.ru

нач. технологического отдела А.А. Мерзликина,

зам. ген. директора Н.В. Пономарева

(Молкомбинат «Воронежский») тел. (473) 242-53-49

E-mail: tehnolog@molvest.ru

Head of the department A.N. Ponomarev

(Voronezh state university of engineering technologies) Department of processing products of animal raw material. phone (473) 255-37-51

associate Professor G.P. Shuvaeva

(Voronezh state university of engineering technologies) Department of biochemistry and biotechnology. phone (473) 255-55-57

E-mail: gpshuv@mail.ru

head of tech. department A.A. Merzlikina,

deputy general director N.V. Ponomareva

(Jsc Milk processing factory «Voronezhskii») phone (473) 242-53-49

E-mail: tehnolog@molvest.ru

Биотехнология кефира с новыми свойствами

Biotechnology for kefir with new qualities

Реферат. Современное кефирное производство базируется на сквашивании молока с использованием кефирных грибов путем спиртового и молочнокислого брожений. Микроорганизмы закваски ферментируют крупные молекулы казеина, в результате чего они усваиваются организмом намного эффективнее. Благодаря особому составу микробиоты закваски, в состав которой входят молочнокислые и уксуснокислые бактерии и дрожжи, кефир особенно полезен для человека любого возраста, способствует восстановлению энергетического баланса человека, благотворно действует на нервную систему и обменные процессы. На основе традиционной технологии производства кефира, включающей: нормализацию, гомогенизацию, пастеризацию, охлаждение до температуры заквашивания, внесение производственной закваски, разработана технология производства кефира с внесением фермента трансклутаминазы, которая обеспечивает генерацию собственного лактоферрина микроорганизмами в составе кефирных грибов. Содержание лактоферрина варьирует от 500 до 1100 мг/л, что значительно превышает этот показатель в контроле (300 мг/л). Лактоферрин, как известно, является естественным антиоксидантом, который предотвращает эффект раннего старения организма, способствует сохранению здорового желудочно-кишечного тракта. Во многих отношениях, лактоферрин способствует сохранению здоровья и оказывает полную поддержку активному долголетию.

Summary. Modern kefir production is based on the milk acidification process with the use of kefir grains by alcohol and lactic acid fermentation. Casein large molecules are fermented by sourdough' microorganisms, and as a result they are digested much more effectively by the body. Thanks to a special composition of the sourdough' microbiota, which composed of yeast, lactic acid and acetic acid bacteria, kefir is especially useful for a person of any age, helps to restore energy balance of human body, beneficial effects on the nervous system and metabolic processes. On the basis of the traditional technology of kefir production, which includes processes of normalization, homogenization, pasteurization, cooling to a temperature of fermentation, injection of sourdough, has been developed kefir production technology with the introduction of the ferment transglutaminase that provides the generation of its own lactoferrin by the composition of microorganisms in kefir grains. Lactoferrin content ranges from 500 to 1100 mg/l, which is considerably higher than in the control group (300 mg/l). Lactoferrin is natural antioxidant that prevents the effect of early aging of the organism, contributes to the preservation of a healthy gastrointestinal tract. In many ways lactoferrin contributes to the preservation of health and fully supports the active longevity.

Ключевые слова: кефир, закваска, фермент, трансклутаминаза, белок, лактоферрин, температура, образование связей.

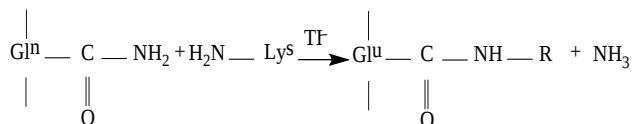
Keywords: kefir, leaven, enzyme transglutaminase, protein, lactoferrin, temperature, conformation links.

© Пономарёв А.Н., Шуваева Г.П., Мерзликина А.А.,
Пономарева Н.В., 2014

Кефир – это напиток с уникальным составом микробиоценоза, что выгодно отличает его от других кисломолочных продуктов. Порядка двух десятков видов микробных культур, в том числе: дрожжей, молочнокислых и уксуснокислых бактерий, благоприятно влияют на микрофлору желудочно-кишечного тракта, проявляя бактерицидные свойства по отношению к возбудителям ряда желудочно-кишечных заболеваний.

Известен способ производства кефира, включающий пастеризацию и гомогенизацию молока, его охлаждение, заквашивание кефирными грибами, которые предварительно культивируют в молоке, последующее сквашивание при оптимальной температуре, созревание. Способ несовершенен, так как получаемый продукт имеет незначительный срок годности и характеризуется невысокими органолептическими и физико-химическими показателями [1]. Цель данной работы – разработка биотехнологии кефира (для исключения недостатков существующей технологии) и получение продукта с новыми биологическими свойствами. Для решения поставленной задачи на стадии внесения производственной закваски, одновременно с ней вносили фермент транслглютаминазу (Saprona TG 1L производитель -TFI, Германия), используемую для производства творога, йогуртов и свежего сыра в целях улучшения качества и структуры готового продукта.

Свойством транслглютаминазы является образование дополнительных связей в молекулах белка, приводящих к «сшиванию» белковых молекул. Фермент катализирует реакцию ацильного переноса между γ -карбоксиамидной группой глутаминового остатка белка или пептида (ацил-донор) и первичными аминогруппами разнообразных аминокислотных соединений (ацил-акцептор), включая ϵ -аминогруппу лизинового остатка пептида по схеме:



В результате образуются высокомолекулярные соединения, содержащие ϵ -(γ -глутамил)-лизинового внутри- и межмолекулярные изопептидные связи, оказывающие влияние на структуру и функциональные свойства белков. Ковалентные связи, образованные транслглютаминазой между свободными ами-

ногруппами (свободных, либо из боковых цепей лизина) и гамма-карбоксамидными группами глутамина, устойчивы к протеолизу. Специфические изопептидные связи возникают между белками. Транслглютаминаза воздействует исключительно на протеины. Связи образуются как внутри молекулы протеина, так и между отдельными его молекулами. Катализируется опосредованное через глутаматдегидрогеназу дезаминирование природных аминокислот и биосинтез аминокислот. Когда фермент взаимодействует с белком, то может иметь место образование поперечной связи ϵ -(γ -Glu)-Lys и замещение Gln на Glu в результате дезамидирования [2,3].

Как показали исследования, внесение транслглютаминазы в молоко одновременно с производственной закваской, обеспечивает синтез микробного лактоферрина.

В эксперименте производство кефира проводили по схеме: нормализация, гомогенизация, пастеризация, охлаждение до температуры заквашивания, внесение производственной закваски. Количество вносимой закваски по отношению к нормализованной смеси варьировали в пределах от 1,5 % до 3,0 %.

Одновременно с закваской вносили фермент транслглютаминазу из расчета от (0,1 до 0,5) кг на 1000 кг нормализованной смеси. Большее количество вносимого фермента нецелесообразно, так как ухудшает качество готового продукта.

Как показал эксперимент, максимальный синтез лактоферрина достигался при внесении закваски с массовой долей 2,0 % (таблица 1). Увеличение количества вносимого фермента ухудшает структуру кефира: появляется неоднородность продукта, интенсивное отделение сыворотки (таблица 2)

Биохимические пути, по которым осуществляется синтез лактоферрина у микроорганизмов, схожи с таковыми у других организмов. Установлена способность кефирных грибов, представляющих собой симбиоз молочнокислых бактерий р.р. *Lactococcus*, *Lactobacillus* и дрожжей *Saccharomyces lactis* к синтезу собственного бактериального лактоферрина (БЛФ). Возможно, внесение в смесь фермента транслглютаминазы активизирует способность бактерий к синтезу собственного лактоферрина для их выживания.

Т а б л и ц а 1

Содержание лактоферрина в кефире

Количество вносимой закваски, кг/1000 кг смеси	Количество фермента, кг/1000 смеси	Массовая доля лактоферрина, мг/дм ³
1,5	0,1	100
	0,2	160
	0,3	200
	0,4	250
	0,5	250
2,0	0,1	600
	0,2	1100
	0,3	1000
	0,4	780
	0,5	500
2,5	0,1	600
	0,2	460
	0,3	450
	0,4	320
	0,5	480
3,0	0,1	230
	0,2	310
	0,3	280
	0,4	210
	0,5	160
Контроль (традиционная технология)	0,0	300

Т а б л и ц а 2

Органолептическая оценка кефира

Показатель, характеристика	Оценка, баллы									
	Контроль (без внесения фермента)					Опыт (с внесением фермента)				
	Время хранения, сут.									
	1	3	7	10	14	1	3	7	10	14
Отделение сыворотки	5	5	4	4	4	5	5	5	5	5
Вязкость	5	5	5	4	4	5	5	5	5	5
Однородность	5	5	4	4	4	5	5	5	5	5

Специфичность трансаминаз обеспечивается именно белковым компонентом. Фермент катализирует перенос NH_2 -группы не на α -кетокислоту, а сначала на кофермент пиридоксальфосфат. Образовавшееся промежуточное соединение (основание Шиффа) подвергается внутримолекулярным превращениям (лабильзация α -водородного атома, перераспределение энергии связи), приводящим к освобождению α -кетокислоты и пиридоксаминфосфата; последний на второй стадии реакции

реагирует с любой другой α -кетокислотой, что через те же стадии образования промежуточных соединений (идущих в обратном направлении) приводит к синтезу новой аминокислоты и освобождению пиридоксальфосфата.

В связи с тем что во всех трансаминазах карбонильная группа кофермента ($-\text{CHO}$) связана с ε -аминогруппой лизина белковой части взаимодействие между субстратом, т.е. L-аминокислотой и пиридоксальфосфатом происходит не путем конденсации с выделением молекулы воды, а путем реакции замещения, при которой NH_2 -группа субстрата вытесняет ε - NH_2 -группу лизина в молекуле ферментного белка, что приводит к формированию пиридоксальфосфатного комплекса. Все или почти все природные аминокислоты (исключение составляет метионин) сначала реагируют с α -кетоглутаровой кислотой в реакции трансаминирования с образованием глутаминовой кислоты и соответствующей кетокислоты. Образовавшаяся глутаминовая кислота затем подвергается непосредственному окислительному дезаминированию под действием глутаматдегидрогеназы. Поскольку обе реакции (трансаминирование и дезаминирование глутаминовой кислоты) являются обратимыми, создаются условия для синтеза по существу любой аминокислоты, если в среде имеются соответствующие α -кетокислоты. Таким образом, транслглютаминаза катализирует опосредованное через глутаматдегидрогеназу дезаминирование природных аминокислот и биосинтез новых аминокислот. При активном действии фермента, которое выражается в повышенном образовании новых молекул аминокислот, происходит активация реакций анаболизма у микробной ассоциации, что и приводит к увеличению лактоферрина в готовом продукте [4,5,6].

Таким образом, модифицированный способ производства кефира позволяет получить:

- продукт с улучшенными реологическими свойствами и органолептическими показателями;
- исключить добавление сухого обезжиренного молока для улучшения консистенции путем увеличения белка в готовом продукте;
- увеличить срок хранения готового продукта до 14 суток, за счет снижения степени синерезиса в процессе хранения.

Предлагаемая технология производства кефира с внесением одновременно с закваской фермента транслглютаминазы обеспечивает генерацию собственного лактоферрина микроорганизмами в составе кефирных грибов в количестве от 500 до 1100 мг/л (по сравнению с контролем до 300 мг/л).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Пат. 2279807 RU Способ производства кефира / Текеев А.А. Заявл. 13.04.2005; Оpubл. 20.07.2006, Бюлл. № 20.
- 2 Данилов Н.П. Применение трансглутаминазы в производстве ферментированных молочных продуктов: автореф. дис. ... канд. тех. наук. СПб, 2011. 24 с.
- 3 Жеребцов Н. А., Попова Т. Н., Артиухов В. Г. Биохимия: учебник. Воронеж: ВГУ, 2002. 696с
- 4 Ленгелер Й., Древис Г., Шлегель Г. Современная микробиология: Прокариоты. М.: Мир, 2005. 656 с.
- 5 Leahy S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.H., Van Sinderen D. Улучшить самочувствие с бифидобактериями // Журнал прикладной микробиологии. 2005. № 98. С 1303–1315
- 6 Luc de Vuyst, Bart Degeest Полисахариды молочнокислых бактерий // Микробиология. 1999. № 23. С. 153 – 157.

REFERENCES

- 1 Tekeev A.A. Spособ proizvodstva kefir [Production method for kefir]. Patent RF, no. 2279807, 2006. (In Russ.).
- 2 Danilov N.P. Primenenie transglutaminazy v proizvodstve fermentirovannykh molochnykh produktov. Avtoref. dis. kand. tekhn. nauk [Application of transglutaminase in the production of fermented dairy products. Cand. tech. sci. dis.]. Sent-Petersburg, 2011. 24 p. (In Russ.).
- 3 Zheregtsova N.A., Popova T.N., Artiukhov V.G. Biokhimiia [Biochemistry]. Voronezh, VSU, 2002. 696 p. (In Russ.).
- 4 Lengeler I., Drevis G., Shlegel G. Sovremennaiia mikrobiologiia: Prokarioty [Modern microbiology: Prokaryotes]. Moscow, Mir, 2005. 656 p. (In Russ.).
- 5 Leahy S.C., Higgins D.G., Fitzgerald G.H., Van Sinderen D. Getting better with bifidobacteria. *Zhurnal prikladnoi mikrobiologii*. [Journal of applied microbiology], 2005, no. 98, pp. 1303–1315. (In Russ.).
6. Luc de Vuyst, Bart Degeest Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *Mikrobiologiia*. [Microbiology]. 1999, no. 23, pp. 153-157. (In Russ.).