

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ *LACTOBACILLUS FERMENTUM* НА БЕЛКОВЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ ПРОФИЛЬ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ И ТВОРОГА

Тошпулатова М.Ф., Абдуллаев А.О., Мустафаева Г.Т.

Ташкентский международный университет Кимё

Аннотация. В работе проведено комплексное исследование общего белка, растворимых белковых фракций и свободных аминокислот в твороге и сыворотке, полученных биотехнологическим и кислотным способами коагуляции. Общее содержание белка определяли методом Кьельдаля, растворимый белок — методом Лоури, молекулярно-массовое распределение — методом SDS-PAAG, свободные аминокислоты — методом ВЭЖХ после дериватизации фенилизотиоцианатом. Установлено, что ферментация с использованием *Lactobacillus fermentum* способствует изменению белкового профиля и увеличению содержания свободных аминокислот.

Ключевые слова: творог, сыворотка, общий белок, метод Кьельдаля, метод Лоури, SDS-PAAG, ВЭЖХ, аминокислотный состав.

Введение. Белки молока являются основным компонентом, определяющим пищевую и биологическую ценность молочных продуктов. Способ коагуляции (ферментация или кислотная денатурация) оказывает существенное влияние на структурные и количественные характеристики белкового комплекса.

Цель исследования — сравнительная оценка белкового и аминокислотного состава творога и сыворотки, полученных с применением молочнокислой бактерии и лимонной кислоты.

Объекты исследования

Объектом исследования являлось молоко коровье питьевое пастеризованное (ТМ «Lactel») со следующими физико-химическими показателями:

- массовая доля жира — 3,2%;
- массовая доля белка — 3,0% (стандартное значение для данного продукта);
- массовая доля углеводов — 4,7%.

В качестве коагулирующих агентов использовали:

1. Биотехнологический способ: чистая культура молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum*.
2. Кислотный способ: раствор лимонной кислоты (пищевой) до достижения изоэлектрической точки казеина.
3. Сут зардоби (сыворотка молочная).
4. Қатик зардоби (сыворотка кисломолочная).

Материалы и методы

1. Определение общего белка (метод Кьельдаля)

Метод основан на минерализации органического вещества концентрированной H_2SO_4 с последующим определением общего азота и пересчетом на белок (коэффициент 6,38).

Массовую долю белка рассчитывали по формуле:

$$Y = K \times XY = K \times X$$

где:

$K = 6,38$;

X — массовая доля азота (%).

Результат определяли как среднее арифметическое пяти параллельных испытаний.

Таблица-1

Результаты определения общего белка (метод Кьельдаля)

№	Образец	Азот (%)	Белок (%)
1	Творог из катыка	0,28	1,79
2	Творог из молока (Контроль)	1,37	8,75
3	Молочная сыворотка (Контроль)	0,06	0,41
4	Сыворотка из катыка	0,98	6,25

Контрольный образец творога характеризовался более высоким содержанием общего белка.

2. Определение растворимого белка (метод Лоури)

Метод основан на биуретовой реакции и восстановлении реактива Фолина–Чокальтеу ароматическими аминокислотами.

Таблица-2

Определение растворимого белка (метод Лоури)

Образец	Белок (мкг/мл)
Молочная сыворотка (Контроль)	1034
Сыворотка из катыка	1388
Творог из молока (Контроль)	875
Творог из катыка	179

Кисломолочная сыворотка содержит больше растворимого белка, что связано с протеолитической активностью бактерий.

3. Электрофоретическое разделение белков (SDS- PAAG)

Фракционирование белков проводили методом электрофореза в денатурирующих условиях в 12% полиакриламидном геле (SDS-PAAG) по Лэммли.

Подготовка проб: Образцы творога и сыворотки смешивали с буфером для нанесения (0,0625 М Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% глицерин; 5% β -меркаптоэтанол; 0,01% бромфеноловый синий) в соотношении 1:1 и инкубировали при 95°C в течение 5 минут.

Условия электрофореза:

Электродный буфер: Трис-глициновый (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8,3).

Режим разделения: Напряжение составляло 80 В (в концентрирующем геле) и 120–150 В (в разделяющем геле) до момента выхода красителя к нижнему краю геля.

Нагрузка: В лунки наносили по 15–20 мкл подготовленной пробы (что соответствует примерно 20–40 мкг белка на трек для четкой визуализации фракций). Стандарты: Для определения молекулярной массы использовали маркеры широкого диапазона (например, Unstained Protein Molecular Weight Marker, 14.4–116 kDa).

Визуализация:

Окрашивание: Гели фиксировали и окрашивали 0,1% раствором Кумасси бриллиантового синего (Coomassie Brilliant Blue R-250) в смеси метанол:уксусная кислота:вода (соотношение 5:1:4) в течение 1–2 часов.

Отмывка: Лишний краситель удаляли (дестайнинг) многократной промывкой в растворе 7% уксусной кислоты и 10% этанола до появления четких белковых полос на прозрачном фоне.

В сыворотке молочной выявлены белки 20–22 кДа. В кисломолочной сыворотке — фракции 15, 20, 25 и 35 кДа.

Полученные данные свидетельствуют о более выраженном протеолизе в ферментированном образце.

4. Определение свободных аминокислот методом ВЭЖХ

Осаждение белков проводили 20% ТМУК. После дериватизации фенилизотиоцианатом анализ выполняли на хроматографе Agilent Technologies 1200 с DAD-детектором (269 нм).

Параметр	Рекомендуемое значение
Колонка	C18 (например, Agilent Zorbax Eclipse AAA или Hypersil ODS), 4.6 x 150 мм, 5 мкм
Температура колонки	40°C (стабильная температура важна для разделения пиков ПТГ-производных)
Скорость потока	1.0 мл/мин
Детектирование	DAD, длина волны 269 нм (максимум поглощения фенилтиогидантоинов)
Объем инъекции	10–20 мкл

Таблица-3

Суммарное содержание свободных аминокислот (мг/г)

Образец	Σ аминокислот
Молочная сыворотка (Контроль)	4,095
Сыворотка из катыка	5,801
Творог из молока (Контроль)	92,528
Творог из катыка (кисломолочный творог)	13,576

Таблица-4

В ферментированных образцах отмечено увеличение свободных аминокислот, особенно пролина, гистидина и глутаминовой кислоты.

Аминокислота	Контроль (до ферментации)	Ферментированный образец	Изменение (%)
Глутаминовая кислота	45.2 ± 2.1	112.5 ± 5.4	+148%
Пролин	12.8 ± 0.9	88.4 ± 3.2	+590%
Гистидин	8.4 ± 0.5	35.6 ± 1.8	+323%

Аланин	22.1 ± 1.2	41.2 ± 2.0	+86%
Валин	15.3 ± 0.8	28.9 ± 1.1	+89%
Лейцин	18.6 ± 1.1	34.2 ± 1.5	+83%
Фенилаланин	10.2 ± 0.6	19.5 ± 0.9	+91%
Сумма аминокислот	132.6	360.3	+171%

Обсуждение

Комплексный анализ показал, что способ коагуляции существенно влияет на белковый профиль продукта.

-Метод Кьельдаля отражает общее содержание белка.

-Метод Лоури характеризует растворимые фракции.

-SDS-PAAG демонстрирует изменение молекулярных масс.

-ВЭЖХ позволяет количественно определить свободные аминокислоты.

Ферментация с участием *Lactobacillus fermentum* приводит к частичному гидролизу белков и изменению аминокислотного состава, что повышает биологическую доступность продукта.

Заключение

1. Контрольный творог характеризуется более высоким содержанием общего белка.
2. Кисломолочная сыворотка содержит больше растворимых белков.
3. Ферментация изменяет молекулярно-массовой профиль белков.
4. В ферментированных образцах увеличивается содержание свободных аминокислот.

Полученные результаты подтверждают перспективность биотехнологического способа получения творога для формирования функциональных молочных продуктов.

Выводы

1. Ферментация приводит к глубокому гидролизу белков субстрата, что подтверждается исчезновением тяжелых белковых полос на электрофореграмме.
2. Общее содержание свободных аминокислот увеличилось в 3.3 раза по сравнению с исходным сырьем.
3. Наиболее выраженная динамика отмечена для глутаминовой кислоты, пролина и гистидина, что определяет специфический органолептический профиль и биологическую ценность продукта.

Список использованной литературы

1. Смирнов, В. В. Молочнокислые бактерии и их использование в пищевой промышленности Москва. 2017.
2. Калашников, В. А. Молочные бактерии и их использование в пище. – Москва: Академия 2017.
3. Agilent Technologies. Amino Acid Analysis using Agilent Zorbax Eclipse Plus Columns and the Agilent 1260/1290 Infinity II LC Systems. – *Technical Overview*, 2022. – Publication No. 5991-8502EN.

4. Bayer, B., et al. SDS-PAGE: Methods and Protocols // *Methods in Molecular Biology*. – 2024. – Vol. 2735. – P. 3–20.
5. Bidlingmeyer, B. A., et al. (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography*. (Pico-Tag/PITC метод).
6. He, W., et al. Modern Approaches to Protein Precipitation and Sample Preparation for Chromatographic Analysis // *Analytica Chimica Acta*. – 2025. – Vol. 1320. – Art. 341850.
7. Karakas, B., et al. Optimization of pre-column derivatization methods for amino acid analysis in complex food matrices // *Food Chemistry*. – 2023. – Vol. 405. – Art. 134816.
8. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. (Электрофорез).
9. Rutherford, S. M., Gilani, G. S. Amino Acid Analysis: Current Methods and Challenges // *Journal of AOAC International*. – 2023. – Vol. 106. – No. 1. – P. 11–22.
10. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W., Carr, P. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography. – 4th ed. – John Wiley & Sons, 2023. – 1024 p.