

Научная статья
УДК 637.144.5
EDN: GEWFBW
DOI: 10.21285/achb.935



Влияние физико-химических факторов на специфическую активность протеаз, применяемых в биотехнологии сыров

Ю.Г. Стурова*✉, А.В. Гришкова******, В.В. Коньшин*, А.Ю. Просеков****

*Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова,
Барнаул, Российская Федерация

**Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия, Барнаул, Российская Федерация

***Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Российская Федерация

****Кемеровский государственный университет, Кемерово, Российская Федерация

Аннотация. В технологии производства сыров важным технологическим звеном является получение сгустка под влиянием протеолитических ферментов. В зависимости от состава молокосвертывающие ферментные препараты по-разному влияют на качественные характеристики сгустка, отделение сыворотки и выход готового продукта. Сегодня на российском рынке представлен широкий ассортимент отечественных и импортных молокосвертывающих ферментных препаратов. В связи с этим выбор коагулянта молока сыродельными предприятиями должен осуществляться в соответствии с тем, сыры какой группы вырабатываются предприятием. На молокосвертывающую активность ферментных препаратов может оказывать влияние активная кислотность смеси, а также температура раствора при приготовлении ферментного препарата, так как она является основным показателем продолжительности свертывания смеси и, следовательно, качества образованного сгустка. Исследование специфической активности молокосвертывающих ферментных препаратов при их приготовлении в рабочем растворе с различной активной кислотностью (рН от 4,0 до 8,0) показало, что при сдвиге активной кислотности в щелочную сторону молокосвертывающая активность всех препаратов значительно снижалась. Применение растворов с рН 4,0 приводило к увеличению молокосвертывающей активности говяжьего пепсина на 94%, сычужно-говяжьего препарата ВНИИМС СГ-50 – на 72%, сычужного фермента – на 36% относительно контроля. Самым чувствительным к колебаниям активной кислотности являлся говяжий пепсин. Исследование влияния температуры субстрата в диапазоне от 30 до 40 °С показало, наибольшей чувствительностью к изменению температуры отличался сычужный фермент. Проведенные исследования показали, что правильно подобранная ферментная композиция является действенным рычагом, влияющим на качество вырабатываемого сыра.

Ключевые слова: молокосвертывающие ферменты, молокосвертывающая активность, термостабильность, ферментативное свертывание, активная кислотность, пепсин, химозин, ферментные композиции

Для цитирования: Стурова Ю.Г., Гришкова А.В., Коньшин В.В., Просеков А.Ю. Влияние физико-химических факторов на специфическую активность протеаз, применяемых в биотехнологии сыров // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14. N 3. С. 352–361. DOI: 10.21285/achb.935. EDN: GEWFBW.

Influence of physicochemical factors on the specific activity of proteases used in cheesemaking biotechnology

Yuliya G. Sturova*✉, Anastasiya V. Grishkova*****,
Vadim V. Konshin*, Alexander Yu. Prosekov****

*Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russian Federation

**Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul, Russian Federation

***Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation

****Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. The formation of a clot under the influence of proteolytic enzymes is an essential stage in cheesemaking technology. Depending on their composition, milk-clotting enzyme preparations have a different effect on the quality characteristics of the clot, whey separation, and yield of the finished product. At present, the Russian market offers a wide range of domestic and imported milk-clotting enzyme preparations. In this connection, the choice of a milk coagulant by cheese makers should be carried out in accordance with the cheese group produced by the enterprise. The milk-clotting activity of enzyme preparations depends not only on the active acidity of the mixture, but also on the temperature of the solution used to obtain them. It is the solution temperature that has a determining effect on the duration of the coagulation process and, therefore, the quality of the formed clot. Research into the specific activity of milk-clotting enzyme preparations, obtained in a working solution with different active acidity (pH from 4.0 to 8.0), showed their milk-clotting activity to decrease significantly upon pH shifting to the alkaline region. Application of solutions with a pH of 4.0 led to an increase in the milk-clotting activity of bovine pepsin, VNIIMS SG-50 rennet-bovine preparation, and rennet enzyme by 94, 72, and 36%, respectively, relative to the control. Bovine pepsin demonstrated the highest sensitivity to fluctuations in active acidity. A study into the effect of substrate temperature in the range from 30 to 40 °C established rennet to be the most sensitive preparation to temperature changes. It is concluded that a properly selected enzyme composition is an effective means for affecting the quality of cheese products.

Keywords: milk-clotting enzymes, milk-clotting activity, thermostability, enzymatic coagulation, active acidity, pepsin, chymosin, enzyme compositions

For citation: Sturova Yu.G., Grishkova A.V., Konshin V.V., Prosekov A.Yu. Influence of physicochemical factors on the specific activity of proteases used in cheesemaking biotechnology. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2024;14(3):352-361. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.935. EDN: GEWFBW.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты являются соединениями белковой природы, которые синтезируются в клетках живых организмов и обладают каталитической активностью, оказывая воздействие на протекание биохимических реакций. Производство ферментных препаратов имеет большое практическое значение, так как их применение, например, в сыродельной отрасли, способствует формированию различных органолептических, реологических и физико-химических показателей продукта. Следует отметить, что они могут оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на качество получаемого продукта. Ферментативный распад веществ, входящих в состав молока, является важным процессом при формировании основных качественных характеристик продуктов. Для получения различных характеристик в сыроделии активно используют протеазы и липазы, относящиеся к классу гидролаз.

В технологии производства натуральных сыров является важным процесс получения сгустка под влиянием молокосвертывающих ферментов. В зависимости от происхождения молокосвертывающие ферментные

препараты (МФП) по-разному влияют на качественные характеристики сгустка, сырного зерна, отделение сыворотки и выход готового продукта [1–3].

Применяемые МФП оказывают влияние на процесс созревания и формирование органолептических характеристик сыра. После формирования сгустка в сырной массе находится от 6 до 10% используемого фермента, соответственно, под его действием протекают дальнейшие протеолитические реакции, влияющие на формирование таких важных показателей, как вкус и консистенция сыра [4, 5].

Субстратом для МФП является казеин молока при наличии ионов кальция. Следует отметить, что на формирование вырабатываемого сыра важное влияние оказывают и другие компоненты молока – вода, жир, соли, белки сыворотки.

Протеолитические ферменты, применяемые в сыроделии, относятся к кислым протеазам. Их максимальная активность проявляется в кислой среде. Действие химозина направлено на разрыв связи 105 (Phe) – 106 (Met) в молекуле κ-казеина, тогда как пепсин расщепляет белковую молекулу и по другим

пептидным связям. Требование к МФП заключается в том, чтобы они разрывали связь 105 (Phe) – 106 (Met) во много раз быстрее, чем другие связи в протеинах молока [5–9]. Это важно во время выработки сыра, чтобы произошла коагуляция казеина и значительная часть белка не осталась в сыворотке. Высокая неспецифическая протеолитическая активность МФП в процессе свертывания молока нежелательна, так как при этом растворимые продукты протеолиза остаются в сыворотке, снижая тем самым выход сыра, также теряется для сыра и гликомакропептид, отделяемый МФП от молекулы κ -казеина в результате реакции протеолиза. Тем не менее данная реакция является основной при выработке сычужного сыра, поэтому с этим нужно мириться [5, 10–13].

Молокосвертывающая активность МФП может изменяться в зависимости от породы коровы, от которой получено молоко, а также индивидуальной изменчивости состава молока. Все это в целом можно квалифицировать как влияние происхождения и состава молока [4].

На активность МФП оказывают влияние кислотность смеси, вносимых в нее доз заквасочной микрофлоры и хлористого кальция. Это необходимо учитывать при расчете дозы фермента, которая вносится в смесь для образования сгустка хорошего качества в процессе выработки сыра [4–6].

Важную роль играет температура раствора при приготовлении МФП. Она является основным показателем продолжительности свертывания смеси и, следовательно, качества образованного сгустка. Повышение температуры является физическим катализатором при протекании химических реакций, соответственно, при увеличении температуры должна возрастать скорость реакции. В то же время в случае биологических субстратов нужно работать в узком диапазоне температур, поскольку повышение последней может привести к денатурации фермента, в результате чего он потеряет свою активность.

Существует температурный оптимум, при котором ферментные препараты проявляют наибольшую активность. Для МФП животного происхождения он составляет от 35 до 37 °С.

Активность МФП в значительной степени зависит от величины pH, так как ферменты представляют собой коллоидные белковые вещества. Для каждого фермента существует оптимум pH, при котором протеолитическая реакция протекает с максимально высокой скоростью [5, 6, 14].

В практической деятельности важно соблюдать оптимальный температурный режим и поддерживать требуемый уровень pH во время производства или хранения ферментированных молочных продуктов. Так, например, уровень активной кислотности и влажность сырной массы являются важными факторами, определяющими протеолитическую активность МФП, перешедших в состав сырной массы [15].

Оптимум специфической протеолитической активности химозина при гидролизе казеина находится при pH 4, сывороточного альбумина — при pH 3,4. Специфичность гидролиза казеина химозином в высокой степени зависит от уровня pH. Например, при pH 6,8 химозин в молекуле казеина расщепляет одну из 33 связей, а при pH 2,3 — одну из 8. Это объясняется тем, что при

изменении pH молока продолжительность коагуляции зависит не только от активности МФП, но и от электростатических и гидрофобных параметров мицеллы казеина. При снижении активной кислотности молока с 6,8 до 6,0 происходит уменьшение отрицательного заряда молекулы казеина, следствием чего является снижение сил электростатического отталкивания между мицеллами и одновременное усиление гидрофобных взаимодействий. В совокупности это ускоряет образование сгустка при сычужном свертывании [16–18].

Для поддержания активности фермента в молоко, подвергнутое предварительной тепловой обработке и предназначенное для выработки сырного сгустка, вносят хлористый кальций.

Важно отметить, что все существующие традиционные технологии выработки сычужных сыров отрабатывались на применении сычужного фермента. Такие параметры, как температура свертывания молока, качество сгустка, продолжительность вымешивания и температура второго нагревания, отлив сыворотки и внесение воды, время созревания основывались на использовании сычужного фермента. Подбор заквасочной микрофлоры также происходил с учетом их взаимодействия с сычужным ферментом в зависимости от способности использовать образующиеся в результате протеолитической реакции пептиды в качестве субстрата.

Для выработки сыров с низкой температурой второго нагревания в сыроделии стали широко применять смесь севую композицию, содержащую в своем составе 50% химозина и 50% пепсина. Ее применение позволяет производить сыры более высокого качества в данной группе, чем при использовании химозина или пепсина в чистом виде [19, 20].

Применение чистого пепсина негативно влияет на выход сыра, снижая его на более чем на 0,25%, а также на созревание продукта. Первый фактор важен с экономической точки зрения в объемах промышленного производства, второй – с точки зрения формирования органолептических характеристик продукта. Так, короткие пептиды, образующиеся в процессе гидролиза молекулы белка, являются горькими, что влияет на вкус, а широкий протеолиз в целом оказывает влияние на консистенцию (например, формируя порок «мажущая консистенция»). С этим связана рекомендация для сыров с длительными сроками созревания применять МФП с высоким содержанием химозина (не менее 70%) [19, 20].

Целью проведенных исследований являлась оценка молокосвертывающей (специфической) активности МФП с различным качественным составом в зависимости от pH рабочего раствора ферментного препарата и pH молока, а также температуры субстрата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все исследования, необходимые для проведения данной работы, осуществлялись в лаборатории кафедры технологии продуктов питания и Центре комплексных исследований и экспертной оценки пищевой продукции «АлтайБиоЛакт» Алтайского государственного технического университета им. И.И. Ползунова.

В качестве эталонного образца сравнения применяли Отраслевой контрольный образец сычужного фермента (ОКО СФ) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента». Исследовали сычужный

фермент (СФ), сычужно-говяжий препарат (ВНИИМС СГ-50) и говяжий пепсин (ГП) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента».

Абсолютную молокосвертывающую активность и соотношение активности пепсина и химозина определяли по ОСТ 10 288-2001.

Готовили 1%-ные растворы исследуемых МФП в дистиллированной воде. Перед исследованием растворы ферментов прогревали при 35 °С в течение 15 мин на водяной бане и охлаждали до комнатной температуры.

Процедура определения молокосвертывающей активности состояла в следующем: 5 мл подготовленного субстрата помещали в стеклянные пробирки, выдерживали в течение 5 мин на водяной бане при температуре 35 °С, добавляли 0,1 мл исследуемого ферментного препарата, затем включали секундомер и тщательно перемешивали содержимое пробирки.

Начало реакции коагуляции определяли по образованию хлопьев в капле молока, наносимой на стенки пробирки стеклянной палочкой.

При подготовке субстрата сырое сборное непастеризованное молоко нагревали на водяной бане до температуры 72 °С и выдерживали при этой температуре в течение 10 мин, затем быстро охлаждали в проточной воде до температуры (22±2) °С. В охлажденное молоко вносили хлористый кальций до конечной концентрации 3 мМ. При необходимости активную кислотность молока доводили до 6,5 ед. рН раствором 1,0 М НСl. Подготовленное таким образом молоко использовали для дальнейших исследований.

Расчет молокосвертывающей активности производился по формуле

$$MA = \frac{A}{T_1 \times T_2},$$

где А – аттестованная молокосвертывающая активность ОКО СФ в условных единицах на 0,1 г; T_1 – время свертывания с ОКО СФ; T_2 – время свертывания с исследуемым образцом.

В исследованиях применялись ацетатный (рН 3,7–5,6) и фосфатный (рН 5,8–8,0) буферные растворы. Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «ч.д.а.» или «х.ч.».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

МФП играют двойную роль в процессе выработки сыра: специфическая активность определяет скорость и качество образуемого сгустка, а неспецифическая (протеолитическая активность) – процесс созревания и формирования качественных характеристик продукта.

На первом этапе исследований у всех образцов МФП была определена молокосвертывающая активность при стандартных условиях. Результаты представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что уровень молокосвертывающей активности исследуемых образцов МФП соответствует декларируемой. Кроме того, у натуральных заменителей СФ животного происхождения важно оценивать качественный состав, который подразумевает соотношение основных ферментных компонентов – говяжьего пепсина и химозина. Эти показатели также являются декларируемыми величинами.

Результаты исследования представлены на рис. 1. Из рис. 1 видно, что фактическое содержание химозина

Таблица 1. Молокосвертывающая активность образцов ферментных препаратов

Table 1. Milk-clotting activity of enzyme samples

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, усл.ед./г	
	декларируемая	фактическая
СФ	110000±5000	114512
ВНИИМС СГ-50	110000±5000	111650
ГП	110000±5000	110000

в препарате СФ больше на 19% по сравнению со средним значением декларируемого показателя (химозин ≤ 70, пепсин ≥ 30). В препарате ВНИИМС СГ-50 доля пепсина выше декларируемой величины на 7% (химозин = 50, пепсин = 50). Препарат ГП содержал в своем составе 15% химозина. Следует отметить, что качественный состав отечественных препаратов может быть нестабильным, но тем не менее удовлетворяет требованиям, предъявляемым сыродельным производством [3, 19, 20].

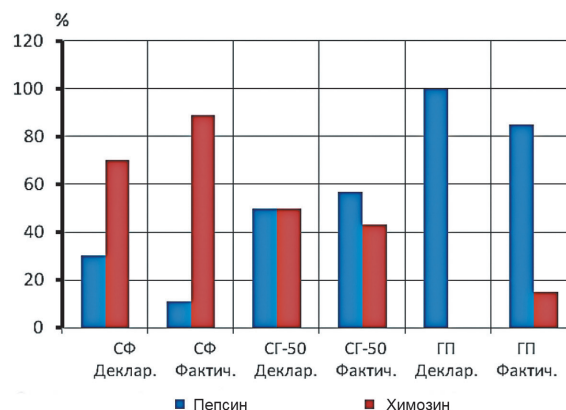


Рис. 1. Состав молокосвертывающих ферментных препаратов

Fig. 1. Composition of milk-converting enzyme preparations

В результате проведенных исследований выявлено, что большей величиной молокосвертывающей активности обладал СФ. Данный результат может быть обусловлен погрешностью выполнения метода измерений. Также это может быть связано с тем, что СФ содержит наибольшее количество химозина, оптимум действия которого приближен к стандартным условиям свертывания молока: рН 6,5 усл.ед., 35 °С. Кроме того, колебания активности препаратов могут изменяться в зависимости от кислотности, качества и состава перерабатываемого молока, от количества внесенного хлористого кальция. Данная информация на сыродельных предприятиях может способствовать наиболее оптимальному расходу препаратов [12, 16, 18].

Активная кислотность (рН) раствора МФП влияет на их активность. Каждый фермент проявляет свою максимальную активность в узком диапазоне, при этом сдвиг рН среды может снижать уровень молокосвертывающей активности ферментов. Поэтому рН раствора МФП является важным показателем.

На рис. 2 приведен график зависимости уровня молокосвертывающей активности ферментного пре-

парата от уровня активной кислотности раствора при изменении активной кислотности буферных растворов от 4,0 до 8,0 усл.ед. с дискретностью 1,0 усл.ед. По результатам исследования видно, что специфическая (молокосвертывающая) активность исследованных ферментных препаратов, приготовленных в растворе с рН 7,0 ед., находилась приблизительно на одном уровне. Сдвиг кислотности в кислую или щелочную сторону способствовал, соответственно, увеличению или снижению молокосвертывающей активности МФП.

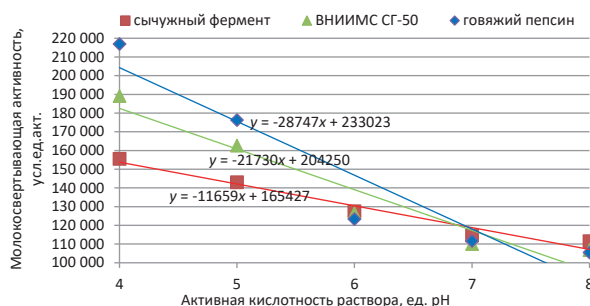


Рис. 2. Зависимость уровня молокосвертывающей активности ферментного препарата от уровня активной кислотности водного раствора

Fig. 2. Relationship between milk-clotting activity level of enzyme preparation and active acidity level of aqueous solution

Наиболее высокая активность была присуща ферментным препаратам, рН раствора которых лежал в диапазоне от 4,0 до 5,0 ед. С увеличением доли пепсина в составе МФП активность фермента росла при значении рН 4,0. При сдвиге рН в щелочную сторону молокосвертывающая активность всех препаратов значительно снижалась. Так, при снижении активной кислотности от 7,0 до 8,0 ед. рН молокосвертывающая активность ГП уменьшалась на 5,4%, ВНИИМС СГ-50 – на 2,8%, СФ – на 2,6% относительно контроля. Применение растворов с рН 4,0 ед. приводило к увеличению молокосвертывающей активности ГП на 94%, ВНИИМС СГ-50 – на 72%, СФ – на 36% относительно контроля. Это объясняется тем, что оптимумом действия всех МФП, как было сказано выше, является кислая среда, а в щелочной они начинают терять свою активность. Следует отметить, что при этом активность МФП остается в пределах нормы [12, 16, 18].

Из приведенных на рис. 2 результатов исследований можно заключить, что МФП с увеличением доли пепсина становятся более чувствительными к изменениям рН раствора. Так, в случае СФ при снижении рН до 5,0 ед. происходило увеличение молокосвертывающей активности на 25%, а при увеличении рН до 8,0 ед. – снижение на 2,5%. При этом молокосвертывающая активность ГП при рН 5,0 ед. возрастала на 58%, а при рН 8,0 ед. снижалась на 5,4%.

Полученные данные можно применить в практической деятельности. Так, на большинстве сыродельных предприятий для приготовления растворов МФП применяют пастеризованную водопроводную воду, уровень рН которой приближается к значению 8,0 ед. Как было сказано выше, при таких значениях активной кислот-

ности раствора молокосвертывающая активность МФП уменьшается. Это в свое время ведет к излишнему расходу препарата, что экономически нецелесообразно, а также отрицательно влияет на процесс выработки, обуславливая получение рыхлого сгустка, и приводит к порокам вкуса (горького, салостого).

Влияние концентрации ионов водорода в субстрате на продолжительность свертывания представлено на рис. 3. При снижении активной кислотности молока продолжительность образования сгустка зависит не только от молокосвертывающей активности МФП, но и от электростатических и гидрофобных характеристик мицеллы к-казеина. При низких значениях рН молока происходит снижение отрицательного заряда молекулы белка. Это приводит к снижению сил электростатического отталкивания между мицеллами, одновременно усиливает казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия и ускоряет образование сгустка при сычужном свертывании молока. Напротив, увеличение рН молока приводит к более длительному процессу свертывания молока всеми ферментами, что видно из рис. 3. Важно отметить, что СФ является более стабильным при данных изменениях рН: продолжительность свертывания смеси в диапазоне активной кислотности от 5,0 до 8,0 ед. изменилась от 152 до 207 с. Самым чувствительным к колебаниям активной кислотности является ГП: продолжительность свертывания смеси в указанном диапазоне рН изменилась от 109 до 224 с.

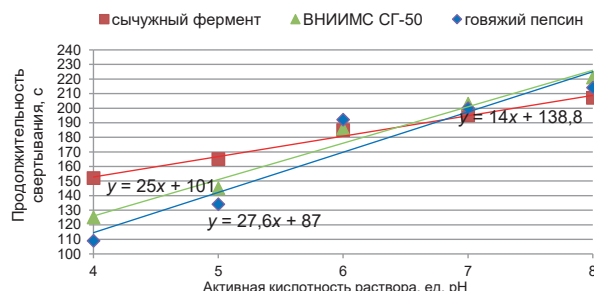


Рис. 3. Влияние концентрации ионов водорода на продолжительность свертывания молока под действием ферментных препаратов

Fig. 3. Effect of hydrogen ion concentration on the duration of milk coagulation under the action of enzyme preparations

Для успешного применения МФП в производстве важно не только учитывать молокосвертывающую активность, заключающуюся в специфической реакции отщепления гликомакропептида от молекулы к-казеина, и неспецифическую протеолитическую активность, характеризующуюся непрерывным расщеплением казеина во времени, что может стать причиной снижения качества вырабатываемого сыра, но и контролировать термостабильность ферментных препаратов. Термостабильность МФП оказывает большое влияние на протеолиз и является одним из основных регуляторов интенсивности и направленности первичных протеолитических реакций при созревании сыра. Результаты исследования этого параметра показали, что в зависимости от качественного состава МФП имеют различную устойчивость к воздействию температуры.

График изменения уровня молокосвертывающей

активности ферментных препаратов при изменении температуры молока в качестве субстрата с внесением всех компонентов, применяемых при выработке сыра, от 30 до 40 °С с шагом в 5 °С приведен на рис. 4, а изменение продолжительности свертывания молока при нарастании температуры инкубирования субстрата представлено на рис. 5.

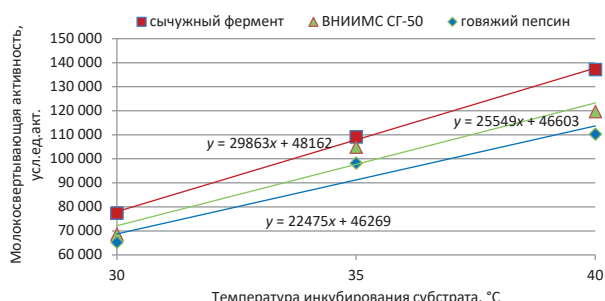


Рис. 4. Изменение уровня молокосвертывающей активности ферментных препаратов при увеличении температуры инкубирования субстрата

Fig. 4. Changes of milk-clotting activity of enzyme preparations versus incubation temperature of the substrate

Наибольшей чувствительностью к изменению температуры отличался СФ. Значительные колебания молокосвертывающей активности наблюдались при повышении температуры с 30 до 35 °С. ВНИИМС СГ-50 увеличил свертывающую активность в этом диапазоне на 34,6%, ГП – на 33,5%, а СФ – на 29%. С повышением температуры инкубирования субстрата молокосвертывающая активность ферментных препаратов нарастает, достигая наибольших значений при 40 °С.

Температура молока является важным параметром, влияющим на свойства сгустка. Оптимальным для получения плотного, не образующего сырной пыли сгустка

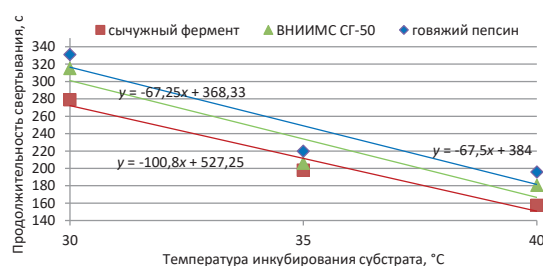


Рис. 5. Влияние температуры субстрата на продолжительность свертывания под действием ферментных препаратов

Fig. 5. Effect of substrate temperature on the duration of coagulation under the action of enzyme preparations

в сыроделии является диапазон от 33 до 35 °С. Повышение температуры до 40 °С приводит к получению у сгустка резиновой консистенции, поскольку сырное зерно преждевременно приобретает оболочку, следствием чего является плохое отделение сыворотки. Это, в свою очередь, может негативно отразиться на созревании полученного сыра и на формировании его органолептических характеристик [19].

Отдельный интерес представляла оценка качества сгустка и скорости его образования с применением изученных МФП. Для этого в условиях лаборатории был смоделирован процесс выработки сыра с низкой температурой второго нагревания. Физико-химические показатели молочной смеси для проведения эксперимента и основные вносимые компоненты представлены в табл. 2.

Все факторы, которые необходимо учитывать при формировании сгустка, образующегося под воздействием МФП, были максимально приближены к единому значению: температура свертывания составляла 35 °С,

Таблица 2. Физико-химические показатели молочной смеси

Table 2. Physico-chemical parameters of the milk mixture

Показатели смеси	Смесь с СФ	Смесь с ВНИИМС СГ-50	Смесь с ГП
Смесь:			
жир, %		2,9±0,07	
кислотность, °Т		17±0,5	
Внесено на 100 л:			
KNO ₃ , г		20±0,65	
CaCl ₂ , г		35±0,45	
БК Алтай С, %		1,0±0,1	
Кислотность перед свертыванием, °Т	20±0,5	20±0,5	20±0,5
pH	6,46±0,01	6,45±0,01	6,47±0,01
МФП внесено на 100 л смеси:			
СФ 70/30	2,25	–	–
ВНИИМС СГ-50	–	2,25	–
ГП	–	–	2,25
Температура свертывания, °С	35		
Продолжительность, мин:			
свертывания	29	32	34
обработки до второго нагревания (включая разрезку сгустка и отлив сыворотки)	30	30	30

Таблица 3. Органолептические показатели сычужного сгустка

Table 3. Organoleptic parameters of the rennet

Показатель	СФ	ВНИИМС СГ-50	ГП
Структура сгустка	Очень плотный сгусток с четкими границами, без образования хлопьев белка, отлично отделяет сыворотку светло-зеленого цвета	Плотный сгусток с ровными краями, без образования хлопьев белка, хорошо отделяет сыворотку светло-зеленого цвета	Менее плотный сгусток с ровными краями, без образования хлопьев белка, хорошо отделяет сыворотку светло-зеленого цвета
Бальная оценка	5	5	4

кислотность смеси – $(6,46 \pm 0,1)$ ед. pH. Растворы МФП, вносимые в модельные смеси, были приготовлены с применением буферного раствора с активной кислотностью 6,0 ед. pH, оптимальной по результатам проведенных исследований. Процесс образования сгустка во всех образцах протекал активно. Сгусток был плотный, хорошо отделялся от краев, на изломе давал ровные края с выделением прозрачной сыворотки. Зерно равномерно уплотнялось и обсыхало, имело необходимую упругость.

Анализ полученных с помощью секундомера данных показал, что продолжительность свертывания понижалась в ряду ГП > ВНИИМС СГ-50 > СФ. Скорость образования сгустка с применением СФ была максимальной (29 мин) по сравнению с препаратами ВНИИМС СГ-50 (32 мин) и ГП (34 мин), что соответствует допустимым пределам. Согласно нормативной документации на производство полутвердых сыров с низкой температурой второго нагревания, данная величина должна составлять (30 ± 5) мин. Это можно объяснить различным содержанием химозина и пепсина в исследуемых МФП. Химозин синтезируется для обеспечения свертывания молока и поэтому гидролизует ключевую пептидную связь 105 (Phe) – 106 (Met) с образованием крупных фрагментов в отличие от пепсина, атакующего большое количество пептидных связей, как в казеине, так и в белках, поступающих с твердыми кормами [20].

Кроме того, ГП, содержащий в своем составе 85% активности пепсина от общей молокосвертывающей активности МФП, обладает гораздо более высокой протеолитической активностью по сравнению с химозином, гидролизует белки с образованием коротких пептидов, что увеличивает время образования и снижает прочность образования сгустка [3, 16, 17, 20].

Также представляла интерес оценка органолептических показателей полученных сгустков (табл. 3).

Качество сгустка оценивали по пятибалльной шкале. Первые два образца (с применением СФ и ВНИИМС СГ-50) получили наивысший балл, потому что структура сгустка соответствовала требованиям для сыроделия, третий же образец отличался пониженной плотностью сгустка, поэтому ему присвоена оценка 4. Показатели оценки можно объяснить различным содержанием химозина в трех образцах, первый и второй образец обладают большим его содержанием (89 и 57% соответственно), что способствует получению более плотного, однородного сгустка.

Подводя итог, можно сделать вывод, что наилучшие сгустки получались при использовании СФ и ВНИИМС СГ-50. Они образовались с наибольшей скоростью, также обладали большей плотностью, твердостью и упругостью. Следовательно, при выработке сыра с

применением этих ферментов можно будет снизить потери белка и жира с сывороткой в отличие от применения ГП. Это является важным моментом с точки зрения экономики предприятия.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важнейшей задачей сегодняшнего дня для производителей является равномерная в течение всего года работа и круглогодичная поставка на рынок продукции таким образом, чтобы при этом создавались еще и резервы на межсезонный период. Эта задача выполнима при условии применения рычагов регулирования процесса созревания сыров. В частности, выполнение данной задачи можно решить при использовании в выработке сыров композиций ферментных препаратов разного состава.

Качественный состав (соотношение пепсина и химозина) молокосвертывающих ферментов позволит оказывать влияние на длительность процесса созревания сыра, направленно влиять на формирование органолептических характеристик продукта. На активность самих ферментов можно влиять с помощью физическо-химических факторов, например таких, как активная кислотность раствора и температура.

Как показали результаты исследований, МФП с большей долей пепсина в составе проявили большую чувствительность к изменениям pH раствора.

Исследование специфической активности МФП при их приготовлении в рабочем растворе с различной активной кислотностью (pH от 4,0 до 8,0 ед.) показало, что при сдвиге активной кислотности в щелочную сторону молокосвертывающая активность всех препаратов значительно снижалась. Применение растворов с pH 4,0 ед. приводило к увеличению молокосвертывающей активности ГП на 94%, ВНИИМС СГ-50 – на 72%, СФ – на 36% относительно контроля.

Изучение молокосвертывающей активности МФП в зависимости от pH молока (рассматриваемый диапазон от 5,0 до 8,0 ед. pH) показало, что СФ являлся более стабильным при данных изменениях pH. Самым чувствительным к колебаниям активной кислотности являлся ГП.

Исследование влияния температуры субстрата (диапазон значений от 30 до 40 °C) на молокосвертывающую активность МФП показало, наибольшей чувствительностью к изменению температуры отличался СФ.

Оптимальный качественный состав МФП является действенным рычагом, влияющим на качество вырабатываемого сыра, поскольку МФП влияет на качество сгустка, постановку и формирование сырного зерна, отделение сыворотки, регулирует первичные процессы протеолиза и созревание сыра.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kumar A., Sasmal S. Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds: a new source of milk clotting peptidase // *Food Hydrocolloids*. 2020. Vol. 106. P. 105866. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105866.

2. Beltrán-Espinoza J.A., Domínguez-Lujan B., Gutiérrez-Méndez N., Chávez-Garay D.R., Nájera-Domínguez C., Leal-Ramos M.Y. The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk // *International Journal of Dairy Technology*. 2021. Vol. 74, no. 2. P. 297–306. DOI: 10.1111/1471-0307.12760.

3. Myagkonosov D.S., Smykov I.T., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Influence of different milk-clotting enzymes on the process of producing semihard cheeses // *Пищевые системы*. 2023. Т. 6. № 1. С. 103–116. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-103-116. EDN: DPMPUF.

4. Мурунова Г.В., Муничева Т.Э., Калинина Г.Е. «Нестандартность» поведения молокозвертывающих ферментов // *Сыроделие и маслоделие*. 2012. № 6. С. 28–29. EDN: PJOIZD.

5. Гришкова А.В., Просеков А.Ю., Коваль А.Д. Технологические свойства препаратов сычужного фермента // *Сыроделие и маслоделие*. 2023. № 4. С. 56–60. DOI: 10.21603/2073-4018-2023-4-9. EDN: ITJFHF.

6. Стурова Ю.Г., Кригер А.В., Жидких К.В. Факторы, влияющие на активность ферментных препаратов животного происхождения // *Сыроделие и маслоделие*. 2014. № 3. С. 47–49. EDN: QHQC RD.

7. Мордвинова В.А., Абрамов Д.В., Мяконосов Д.С., Овчинникова Е.Г., Муничева Т.Э. Особенности применения микробных МФП в сыроделии // *Научные подходы к решению актуальных вопросов в области переработки молока: сб. науч. тр. к 75-летию со дня основания ВНИИМС*. Углич: Изд-во ВНИИМС, 2019. С. 71–83. EDN: KUNHWN.

8. Nicosia F.D., Puglisi I., Pino A., Caggia C., Randazzo C.L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking // *Foods*. 2022. Vol. 11, no. 6. P. 871. DOI: 10.3390/foods11060871.

9. Rajagopalan A., Aluru V., Sukumaran B.O. Characterisation of hydrolysate for identifying initial peptide cleavage site of κ -casein by milk coagulating *Wrightia tinctoria* serine proteases // *International Dairy Journal*. 2021. Vol. 115. P. 104934. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104934.

10. Saxena S., Sasmal S. Bio-prospecting of waste vegetable resources for isolation of milk clotting proteases // *Journal of the Institution of Engineers (India): Series E*. 2021. Vol. 102. P. 293–298. DOI: 10.1007/s40034-021-00220-6.

11. Zhang X., Tao L., Wei G., Yang M., Wang Z., Shi C., et al. Plant-derived rennet: research progress, novel strategies for their isolation, identification, mechanism, bioactive

peptide generation, and application in cheese manufacturing // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023. P. 1–13. DOI: 10.1080/10408398.2023.2275295.

12. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., et al. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.) // *Foods and Raw Materials*. 2016. Vol. 4, no. 2. P. 58–65. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.

13. Бельнская С.В., Рудометов А.П., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Белов А.Н. [и др.]. Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593. DOI: 10.1134/S0555109918060053. EDN: TNYGNK.

14. Китаевская С.В., Решетник О.А. Влияние низкотемпературной обработки на активность протеолитических ферментов различных видов муки // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020. Т. 10. № 3. С. 439–449. DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-439-449. EDN: CTCQZX.

15. Мяконосов Д.С., Абрамов Д.В., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Протеолитическая активность молокозвертывающих ферментов разного происхождения // *Пищевые системы*. 2022. Т. 5. № 1. С. 47–54. DOI: 10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54. EDN: FKAQJB.

16. Лепилкина О.В., Григорьева А.И. Ферментативный протеолиз при образовании молока в сыр // *Пищевые системы*. 2023. Т. 6. № 1. С. 36–45. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45. EDN: MYSJFF.

17. Тёпел А. Химия и физика молока / пер. с нем. СПб.: Профессия, 2012. 813 с.

18. Милентьева И.С., Давыденко Н.И., Расщепкин А.Н. Подбор рабочих параметров для проведения направленного протеолиза казеина с целью получения биопептидов // *Техника и технология пищевых производств*. 2020. Т. 50. № 4. С. 726–735. DOI: 10.21603/2074-9414-2020-4-726-735. EDN: AELHJQ.

19. Белов А.Н., Кригер А.В., Коваль А.Д., Миклишанский В.А. Формирование органолептических показателей сыров и управление процессом созревания // *Сыроделие и маслоделие*. 2018. № 4. С. 36–38. DOI: 10.31515/2073-4018-2018-4-36-38. EDN: UVCQXH.

20. Кригер А.В., Белов А.Н., Коваль А.Д. Интенсификация процесса созревания сыров и улучшение их качества // *Сыроделие и маслоделие*. 2019. № 4. С. 24–26. EDN: AKDBDN.

REFERENCES

1. Kumar A., Sasmal S. Rheological and physico-chemical properties of milk gel using isolate of pumpkin (*Cucurbita moschata*) seeds: a new source of milk clotting peptidase. *Food Hydrocolloids*. 2020;106:105866. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.105866.

2. Beltrán-Espinoza J.A., Domínguez-Lujan B., Gutiérrez-Méndez N., Chávez-Garay D.R., Nájera-Domínguez C., Leal-Ramos M.Y. The impact of chymosin and plant-derived proteases on the acid-induced gelation of milk. *International Journal of Dairy Technology*. 2021;74(2):297-306. DOI: 10.1111/1471-0307.12760.

3. Myagkonosov D.S., Smykov I.T., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Influence of different milk-clotting enzymes on the process of producing semihard cheeses. *Food Systems*. 2023;6(1):103-116. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-103-116. EDN: DPMPUF.

4. Murunova G.V., Munchieva T.E., Kalinina G.E. "Non-standard" behavior of milk-converting enzymes. *Cheese- and buttermaking*. 2012;6:28-29. (In Russian). EDN: PJOIZD.

5. Grishkova A.V., Prosekov A.Yu., Koval A.D. The main technological properties of rennet enzyme preparations. *Cheese- and buttermaking*. 2023;4:56-60. (In Russian). DOI: 10.21603/2073-4018-2023-4-9. EDN: ITJFHF.

6. Sturova Yu.G., Kriger A.V., Jydkih K.V. Factors effecting activity of the enzymes preparations of the animal origin. *Cheese- and buttermaking*. 2014;3:47-49. (In Russian). EDN: HQQCRD.

7. Mordvinova V.A., Abramov D.V., Myagkonosov D.S., Ovchinnikova E.G., Municheva T.E. Features of the use of microbial milk-clotting enzyme preparation in cheese making. In: *Nauchnye podkhody k resheniyu aktual'nykh voprosov v oblasti pererabotki moloka: sb. nauch. tr. k 75-letiyu so dnya osnovaniya VNIIMS = Scientific approaches to solving topical issues in milk processing: a collection of scientific papers on the 75th anniversary of the founding of VNIIMS*. Uglich: All-Russian Scientific Research Institute of Butter and Cheese Making; 2019, p. 71-83. (In Russian).

8. Nicosia F.D., Puglisi I., Pino A., Caggia C., Randazzo C.L. Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking. *Foods*. 2022;11(6):871. DOI: 10.3390/foods11060871.

9. Rajagopalan A., Aluru V., Sukumaran B.O. Characterisation of hydrolysate for identifying initial peptide cleavage site of κ -casein by milk coagulating *Wrightia tinctoria* serine proteases. *International Dairy Journal*. 2021;115:104934. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104934.

10. Saxena S., Sasmal S. Bio-prospecting of waste vegetable resources for isolation of milk clotting proteases. *Journal of the Institution of Engineers (India): Series E*. 2021;102:293-298. DOI: 10.1007/s40034-021-00220-6.

11. Zhang X., Tao L., Wei G., Yang M., Wang Z., Shi C., et al. Plant-derived rennet: research progress, novel strategies for their isolation, identification, mechanism, bioactive peptide generation, and application in cheese manufacturing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2023;1-13. DOI: 10.1080/10408398.2023.2275295.

12. Lebedev L.R., Kosogova T.A., Teplyakova T.V., Kriger A.V., Elchaninov V.V., Belov A.N., et al. Study of technological properties of milk-clotting enzyme from *Irpex lacteus* (*Irpex lacteus* (Fr.) Fr.). *Foods and Raw Materials*. 2016;4(2):58-65. DOI: 10.21179/2308-4057-2016-2-58-65.

13. Belenkaya S.V., Rudometov A.P., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Kriger A.V., Belov A.N., et al. Biochemical properties of recombinant chymosin in alpaca (*Vicugna pacos* L.). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2018;54(6):585-593. DOI: 10.1134/S0555109918060053. EDN: TNYGHK.

14. Kitaevskaya S.V., Reshetnik O.A. Effects of low-temperature treatment on the activity of proteolytic enzymes in various flour types. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020;10(3):439-449. (In Russian). DOI: 10.21285/2227-2925-2020-10-3-439-449. EDN: CTCQZX.

15. Myagkonosov D.S., Abramov D.V., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Proteolytic activity of milk-clotting enzymes of different origin. *Food systems*. 2022;5(1):47-54. (In Russian). DOI: 10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54. EDN: FKAQJB.

16. Lepilkina O.V., Grigorieva A.I. Enzymatic proteolysis during the conversion of milk into cheese. *Food systems*. 2023;6(1):36-45. (In Russian). DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45. EDN: MYSJFF.

17. Tepel A. Chemistry and physics of milk; 1976, 472 p. (Russ. ed.: *Khimiya i fizika moloka*. St. Petersburg: Profession; 2012, 813 p.).

18. Milenteva I.S., Davydenko N.I., Rasshchepkin A.N. Casein proteolysis in bioactive peptide production: optimal operating parameters. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2020;50(4):726-735. (In Russian). DOI: 10.21603/2074-9414-2020-4-726-735. EDN: AELHJQ.

19. Belov A.N., Kriger A.V., Koval' A.D., Miklishanskii V.A. Formation of the organoleptic properties of cheese and control of cheese ripening process. *Cheese- and buttermaking*. 2018;4:36-38. (In Russian). DOI: 10.31515/2073-4018-2018-4-36-38. EDN: UVCQXH.

20. Kriger A.V., Belov A.N., Koval' A.D. Intensification of the cheese ripening process and improvement of cheese quality. *Cheese- and buttermaking*. 2019;4:24-26. (In Russian). EDN: AKDBDN.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Стурова Юлия Геннадьевна,

к.т.н., доцент,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
✉ y_sturova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4492-6628>

Гришкова Анастасия Викторовна,

к.т.н., доцент,
старший научный сотрудник,
Сибирский научно-исследовательский
институт сыроделия,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yuliy G. Sturova,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
✉ y_sturova@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4492-6628>

Anastasiya V. Grishkova,

Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Researcher,
Siberian Research Institute of Cheese Making,
66, Sovetskoi Armii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,

доцент,
Алтайский государственный
медицинский университет,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40,
Российская Федерация,
anastasiya-kriger@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1117-0489>

Коньшин Вадим Владимирович,
д.х.н., доцент, заведующий кафедрой,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
vadandral@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9335-1824>

Просеков Александр Юрьевич,
д.т.н., профессор, главный научный сотрудник,
Кемеровский государственный университет,
650000, г. Кемерово, ул. Красная, 6,
Российская Федерация,
rector@kemsu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Вклад авторов

Ю.Г. Стурова – разработка концепции
исследования, проведение экспериментов,
обработка полученных данных,
осуществление расчетов, подготовка
иллюстративного материала.
А.В. Гришкова – обработка полученных
данных, осуществление расчетов,
написание текста статьи.
В.В. Коньшин – обсуждение результатов.
А.Ю. Просеков – обсуждение результатов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили
окончательный вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 18.02.2024.
Одобрена после рецензирования 04.08.2024.
Принята к публикации 30.08.2024.

Associate Professor,
Altai State Medical University,
40, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
anastasiya-kriger@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1117-0489>

Vadim V. Konshin,
Dr. Sci. (Chemistry), Associate Professor,
Head of the Department,
Altai State Technical University,
46, Lenin Ave, Barnaul, 656038,
Russian Federation,
vadandral@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0002-9335-1824>

Alexander Yu. Prosekov,
Dr. Sci. (Engineering), Professor, Chief Researcher,
Kemerovo State University,
6, Krasnaya St., Kemerovo, 650000,
Russian Federation,
rector@kemsu.ru
<https://orcid.org/0000-0002-5630-3196>

Contribution of the authors

Yuliya G. Sturova – research concept
development, conducting experiments,
processing the data obtained, calculations,
preparing illustrative material.
Anastasiya V. Grishkova – processing the data,
calculations, writing the text of manuscript.
Vadim V. Konshin – results discussion.
Alexander Yu. Prosekov – results discussion.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests
regarding the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved
by all the co-authors.*

Information about the article

The article was submitted 18.02.2024.
Approved after reviewing 04.08.2024.
Accepted for publication 30.08.2024.