ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

Научная статья
УДК 637.144.5
EDN: IOICNI
DOI: 10.21285/achb.979

Биохимические свойства коммерческих препаратов рекомбинантного химозина

А.В. Гришкова*,,***✉, А.Н. Белов*, А.Д. Коваль*, Ю.Г. Стурова***, О.Н. Мусина*****

**Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Барнаул, Российская Федерация*
***Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Российская Федерация*
****Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Российская Федерация*

Аннотация. *Целью проведенного исследования являлось изучение биохимических свойств коммерческих образцов рекомбинантного химозина, представленных на российском рынке. Одним из важнейших элементов технологии производства натуральных сыров является преобразование молочной смеси в сгусток под действием сычужного фермента или других молокосвертывающих ферментных препаратов. Свертывание молока может осуществляться многими протеазами, способными обеспечить гидролитическое расщепление к-казеина. При этом для получения продукта высокого качества важно учитывать особенности биохимических свойств молокосвертывающего фермента, от которых будут зависеть протеолитические процессы, протекающие в сыре от момента выработки до его созревания. В ходе работы исследовали влияние ионов водорода, кальция и температуры на специфическую (молокосвертывающую) активность ферментных препаратов. Определение активности проводили согласно отраслевому стандарту 10288-2001 «Препараты ферментные молокосвертывающие». Неспецифическую (протеолитическую) активность определяли стандартным методом по Е.Д. Каверзневой, модифицированным для лабораторных исследований молокосвертывающих ферментных препаратов. Согласно полученным результатам, препараты исследуемых коммерческих образцов рекомбинантного химозина по биохимическим свойствам близки к отраслевому контрольному образцу (эталону) сычужного фермента, что позволяет применять их в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания, для которых по классической технологии применяется сычужный фермент. В России генно-инженерные химозины не производят. В связи с этим актуальными являются исследования по разработке технологий получения препаратов отечественного рекомбинантного химозина, которые проводятся сотрудниками Сибирского научно-исследовательского института сыроделия совместно с Государственным научным центром вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.*

Ключевые слова: *молокосвертывающие ферменты, рекомбинантный химозин, сыр, коагуляция, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность, термостабильность, температурный оптимум*

Финансирование. *Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания Минобрнауки РФ (№ 075-03-2024-105, номер темы FZMM-2024-0003, рег. № НИОКТР 124013000666-5).*

Для цитирования: Гришкова А.В., Белов А.Н, Коваль А.Д., Стурова Ю.Г., Мусина О.Н. Биохимические свойства коммерческих препаратов рекомбинантного химозина // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2025. Т. 15. N 2. С. 178–187. DOI: 10.21285/achb.979. EDN: IOICNI.

© Гришкова А.В., Белов А.Н, Коваль А.Д., Стурова Ю.Г., Мусина О.Н., 2025

PHYSICOCHEMICAL BIOLOGY

Original article

Biochemical properties of commercial recombinant chymosin preparations

Anastasiya V. Grishkova*,,***✉, Alexander N. Belov*, Anatoliy D. Koval*, Yuliay G. Sturova***, Olga N. Musina*****

**Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnology, Barnaul, Russian Federation*
***Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation*
****Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russian Federation*

Abstract. *This study investigates the biochemical properties of commercial recombinant chymosin samples available on the Russian market. One of the most critical steps in the production of natural cheese is the coagulation of milk into a curd under the action of rennet or other milk-clotting enzymes. While milk coagulation can be induced by various proteases capable of hydrolyzing κ-casein, the quality of the final product significantly depends on the biochemical properties of the enzyme. These properties influence the proteolytic processes occurring in the cheese from production to maturation. In this work, we examined the effects of hydrogen ions, calcium, and temperature on the specific (milk-clotting) activity of the enzyme preparations. The activity was determined in accordance with the industry standard OST 10288-2001 ("Milk-Clotting Enzyme Preparations"). The non-specific (proteolytic) activity was measured using a standard method of E.D. Kaverzneva, adapted for laboratory studies of milk-clotting enzymes. The results demonstrated that the biochemical properties of the tested commercial recombinant chymosin samples were equivalent to those of the industry reference standard for rennet. This finding supports their suitability for producing cheeses with a high second heating temperature, for which the conventional technology uses rennet. In Russia, the production of genetically engineered chymosins is not currently undertaken. Consequently, the development of domestic production technologies for recombinant chymosin remains highly relevant. Such studies are being conducted by the Siberian Research Institute of Cheese Making in collaboration with the State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (Rospotrebnadzor).*

Keywords: *milk-clotting enzymes, recombinant chymosin, cheese, coagulation, milk-clotting activity, proteolytic activity, thermostability, temperature optimum*

Funding. *The work was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (No. 075-03-2024-105, topic number FM-2024-0003, reg. No. 124013000666-5).*

For citation: Grishkova A.V., Belov A.N., Koval A.D., Sturova Yu.G., Musina O.N. Biochemical properties of commercial recombinant chymosin preparations. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology.* 2025;15(2): 178-187. (In Russian). DOI: 10.21285/achb.979. EDN: IOICNI.

ВВЕДЕНИЕ

Влияние сычужного фермента и прочих коагулянтов молока различного происхождения на молекулу к-казеина является существенным фактором при получении сгустка из молочной смеси при производстве сыра [1, 2]. Важным элементом технологии производства полутвердых сыров с высокой и низкой температурой второго нагревания является процесс созревания, во время которого происходит гидролитический распад белковых компонентов изготавливаемого продукта при совокупном воздействии протеаз заквасочной микрофлоры и молокосвертывающих ферментных препаратов [3–5].

Процесс свертывания молочной смеси может производиться под воздействием большого количества протеолитических ферментов, обладающих способностью гидролизовать к-казеин. Технологи, применяя при выработке сыра конкретные молокосвертывающие ферментные препараты (МФП), должны учитывать, что качество готового продукта напрямую зависит от биохимических свойств конкретного коагулянта. Последние, в свою очередь, должны соответствовать требованиям, предъявляемыми в сыроделии[1] [6–8]. В связи с этим выбор МФП, предлагаемых рынком, должен быть обоснованным и целесообразным с точки зрения производства продукта высокого качества.

Структура рынка молокосвертывающих ферментов претерпела значительные изменения за два десятилетия XXI в. Последние несколько лет превалирует реализация препаратов рекомбинантного химозина. В настоящее время протеолитические ферменты микробного синтеза и животного происхождения пользуются меньшим спросом у производителей сыра (рис. 1).

[1] Wilkinson M.G., Doolan I.A., Kilcawley K.N. Enzyme-modified cheese // Encyclopedia of dairy sciences / eds P.L.H. McSweeney, J.P. McNamara. Academic Press, 2022. P. 166–171. DOI: 10.1016/B978-0-12-818766-1.00260-9.

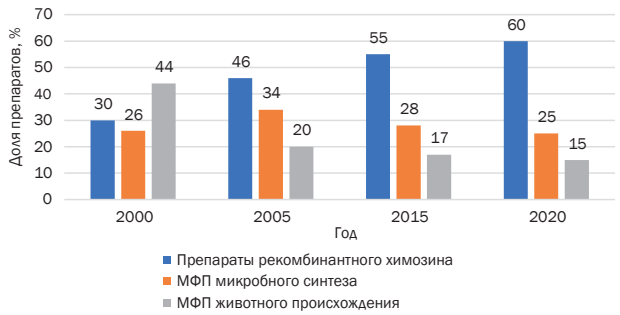

Рис. 1. Изменение соотношения молокосвертывающих ферментных препаратов различного происхождения в структуре мирового рынка

Fig. 1. Change in the ratio of milk-clotting enzyme preparations of various origins in the structure of the world market

По данным Американского фитопатологического общества, уже в 2000 г. в США свыше 90% твердых сыров производилось с рекомбинантным химозином. Преимущество данного химозина заключается в том, что его химическая структура аналогична натуральному, при этом он не содержит пепсина и других гидролаз, экстрагируемых из желудка при производстве МФП животного происхождения. Ко всему прочему, технология производства рекомбинантного химозина не зависит от времени года, исключает необходимость производить убой телят и вероятность передачи болезней крупного рогатого скота. Последнее являлось весомым аргументом для распространения рекомбинантного химозина в связи с возникновением эпидемии губчатой энцефалопатии (коровьего бешенства) в Великобритании и некоторых других странах Западной Европы в 1992 г. [9, 10].

Наиболее широко на рынке представлены такие коммерческие препараты рекомбинантного химозина, как CHY MAX (продуцент – *Aspergilus niger* var. *avamori*) производства Chr. Hansen (Дания) и Maxiren (продуцент – молочные дрожжи *Kluyveromyces lactis*) производства DSM Food Specialties (Нидерланды).

В биотехнологии производства рекомбинантного химозина изначально применялся ген-предшественник телячьего химозина – прохимозин, который клонировался в кольцевую молекулу ДНК некоторых бактерий (например, *Escherichia coli*), в результате чего в прокариотической клетке осуществлялась трансляция химозина[2] [11, 12].

Препараты рекомбинантного химозина могут иметь различия как по применяемым продуцентам, которыми являются, например, бактерии *Escherichia coli* K-12, дрожжи *Kluyveromyces lactis* или грибы *Aspergillus niger* var. *awamori*, так и по варианту внедренного гена. Известны три модификации молекулы химозина: A, B и C. Наибольшей активностью обладает химозин A, который может преобразовываться в химозин C. Химозин B синтезируется в наибольшем количестве. В натуральных МФП животного происхождения присутствуют все три модификации белка, в коммерческих препаратах рекомбинантного химозина это A или B, которые отличаются одной аминокислотой в позиции 286. Важно отметить, что в коммерческих рекомбинантных химозинах могут находиться другие варианты химозинов, которых нет в натуральном сычужном ферменте. Отсутствие примеси пепсина в препаратах рекомбинантного химозина позволяет производителям заявлять о своем продукте как о 100%-м химозине. Это объясняет стремительный рост его производства.

Безусловными преимуществами препаратов рекомбинантного химозина являются их низкая себестоимость, возможность производства больших объемов фермента и, что очень важно, низкая неспецифическая протеолитическая активность [13]. Препараты рекомбинантного химозина, как правило, имеют сертификаты кошерности, а сыры, произведенные с их применением, не запрещены для употребления в пищу вегетарианцами. В период до 1993 г. препараты рекомбинантного химозина были одобрены в 17 странах мира: Великобритании, Ирландии, Швеции, Швейцарии, Бельгии, Дании, Норвегии, Финляндии, Венгрии, Югославии, Польше, Израиле, Чили, Португалии, Южной Африке, Новой Зеландии, США.

Главная проблема широкого использования генно-инженерных химозинов, помимо отрицательного социального суждения, заключается в относительно небольшом опыте применения на практике (не таком широком, как для натуральных препаратов), а также сложности прогноза дальнейших последствий их использования. Документы Всемирной организации здравоохранения, находящиеся в свободном доступе и отражающие исследования по безопасности химозинов генно-инженерного происхождения, указывают на содержание минимальных (следовых) количеств отрезков ДНК продуцента уже после тщательной очистки, в которых определяется очень малая (на пределе чувствительности методов) активность ферментов не химозинового происхождения [14, 15].

Сыры, произведенные в большинстве стран с применением ферментных препаратов, имеют маркировку, свидетельствующую о том, что этот продукт не натуральный. В связи с этим традиционные сыры, которые имеют марку натуральности («Green»), не производятся с применением препаратов рекомбинантного химозина, так как с точки зрения законодательства такие коагулянты молока не являются натуральным сычужным ферментом.

На рынке Российской Федерации рекомбинантные молокосвертывающие препараты реализуются представителями производителей как «100%-й химозин, продуцируемый ферментацией». При этом производитель не раскрывает их генно-инженерного происхождения и дезинформирует несведущего потребителя, поскольку указывает не на происхождение коагулянтов, а на способ производства. В официальных документах Всемирной организации здравоохранения «рекомбинантными химозинами» называются препараты, продуцируемые «генетически-модифицированными организмами». При маркировке довольно популярных у российских сыродельных предприятий препаратов Maxiren и Chy-Max характеристика «генно-инженерный» не применяется, и нередко сыроделы не догадываются о том, какой препарат они используют.

[2] Ельчанинов В.В. Исследование молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04. Кемерово, 2006. 172 с.

Для применения зарубежных препаратов нужно знать их молокосвертывающую активность и ее соотношение с молокосвертывающей активностью препаратов отечественных. Так, 100000 условных российских единиц соответствуют примерно 950 международным молокосвертывающим единицам IMCU (International milk clotting units). Зачастую импортные препараты в два раза активнее российских, соответственно, у них меньший расход.

На пути массового применения «генно-инженерных» химозинов при производстве сыров возникает масса вопросов различного характера: как технологического, гигиено-токсикологического, так и этического, экономического и политического. Споры о безопасности продуктов, полученных с применением таких методов, начались с появлением их на рынке и продолжаются в настоящее время [14].

В связи с вышесказанным целью проведенного исследования являлась оценка основных биохимических параметров коммерческих препаратов рекомбинантного химозина, значимых для регулирования процесса свертывания молочной смеси при выработке сыра.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все необходимые для выполнения работы исследования проводились в лаборатории биохимии молока и молочных продуктов отдела Сибирский научно-исследовательский институт сыроделия Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий (г. Барнаул, Россия).

Для сравнения в качестве контрольного образца использовали «Отраслевой контрольный образец сычужного фермента» (ОКО СФ). Исследованы препараты рекомбинантного химозина: CHY-MAX (продуцент – *Aspergilus niger* var. *avamori*, Chr. Hansen, Дания) и Maxiren 1800 (продуцент – *Kluyveromyces marxianus* v. *lactis*, DSM Food Specialties, Нидерланды).

Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «ч.д.а.» или «х.ч.».

Оценку молокосвертывающей активности проводили согласно ОСТ 10288-2001 «Препараты ферментные молокосвертывающие». Протеолитическую активность определяли стандартным методом по Е.Д. Каверзневой [16], модифицированным для лабораторных исследований молокосвертывающих ферментных препаратов.

Процедура определения молокосвертывающей активности была следующей. К 2,5 мл молока, прогретого при 35 °С не менее 5 мин, добавляли 0,2 мл исследуемого молокосвертывающего фермента и одновременно включали секундомер. Быстро перемешивали смесь стеклянной палочкой и регистрировали время появления первых хлопьев коагулята. Строили график зависимости продолжительности свертывания от pH молока.

Для исследования влияния pH молока на молокосвертывающую активность в пластиковые стаканы наливали молоко по 50 мл в каждый, доводили температуру до комнатной и титровали 1,0 М NaOH или 1,0 М HCl для получения 5 образцов со значениями pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 и 7,0.

С целью исследования влияния концентрации хлористого кальция на молокосвертывающую активность в мерные колбы объемом по 50 мл вносили 0,5 М раствор $CaCl_2$ для получения 6 образцов с конечной концентрацией внесенного хлористого кальция в молоке 0, 1, 2, 3, 4 и 5 мМ.

После прогревания 1%-х растворов сухих МФП в дистиллированной воде в течение 30 мин при температуре от 30 до 70 °С с интервалом в 5 °С определяли термостабильность МФП, проверяя динамику изменения их молокосвертывающей активности.

Температуру прогревания, при которой исследуемый МФП терял 20% молокосвертывающей активности и более от исходной, принимали за порог термоинактивации.

Для определения температурного оптимума (*T*-оптимума) молокосвертывающей активности после прогревания подготовленного субстрата при температуре от 30 до 60 °С с интервалом в 5 °С в течение 10 мин на водяной бане вносили 1%-й раствор сухих МФП и определяли молокосвертывающую активность.

Максимальное значение молокосвертывающей активности принимали за 100%. Порогом Т-оптимума считали температуру, при которой исследуемый МФП сохранял не менее 80%.

Обработка полученных в экспериментах данных проводилась стандартно, математическими и статистическими методами. Статистическую обработку полученных данных проводили на платформе программного ресурса Microsoft Excel.

В России генно-инженерные химозины не производят. В связи с этим исследования по разработке технологии получения препаратов отечественного рекомбинантного химозина, проведенные сотрудниками Сибирского научно-исследовательского института сыроделия Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий совместно с Государственным научным центром вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора [17] и представленные в данной статье, являются актуальными, а их применение имеет большую практическую значимость.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Прежде всего при изучении биохимических свойств МФП рассматривают величину молокосвертывающей активности. Это специфическая реакция, в результате которой происходит разрыв пептидной связи Phe (105)-Met (106) в молекуле к-казеина. В результате этого процесса осуществляется свертывание молока и формирование молочного сгустка. Показатель молокосвертывающей активности является декларируемым, и производитель обязан указать его на товарной упаковке. Важно учитывать, что производитель устанавливает молокосвертывающую активность и рассчитывает дозировку МФП с использованием стандартизированного молочного субстрата. При этом на каждом конкретном сыродельном заводе физико-химические показатели молочной смеси могут отличаться и не совпадать с его показателями. Следствием данного факта могут быть отличия значений молокосвертывающей активности, то есть доза внесения молокосвертывающего фермента на единицу смеси будет отличаться от величины, рекомендуемой производителем коагулянта молока.

На первом этапе исследований молокосвертывающая и протеолетическая активность изученных образцов рекомбинантного химозина была определена при стандартных условиях. Результаты представлены в табл. 1 и на рис. 2.

Таблица 1. Молокосвертывающая и протеолетическая активность образцов ферментных препаратов

Table 1. Milk-clotting and proteolytic activity of enzyme preparation samples

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, у.е./г	Протеолетическая активность, ед. ОП
ОКО СФ	114290	0,184±0,02
Maxiren 1800	223463±1759	0,273±0,02
CHY-MAX	238853±3254	0,189±0,02

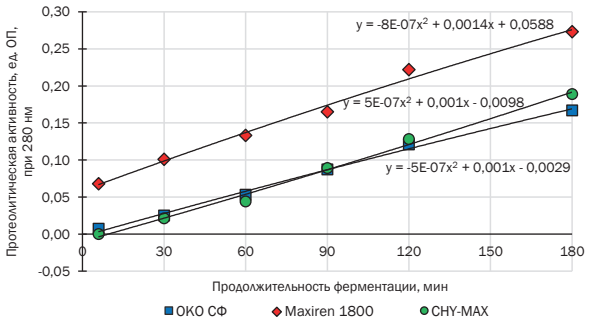

Рис. 2. Протеолитическая активность препаратов рекомбинантного химозина

Fig. 2. Proteolytic activity of recombinant chymosin preparations

Проведенные нами исследования показали, что препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX (0,189 ед. ОП) имел протеолетическую активность, сопоставимую с таковой у ОКО СФ (0,184 ед. ОП). Низкая протеолетическая активность препарата CHY-MAX может быть объяснена высокой степенью очистки, которая в настоящее время достигается производителями. У препарата Maxiren 1800 протеолетическая активность была несколько выше (0,273 ед. ОП) (см. табл. 1, рис. 2).

Физико-химические показатели молочной смеси существенно влияют на величину молокосвертывающей активности МФП. По этой причине важно производить оценку параметра молокосвертывающей активности, учитывая влияние на него таких факторов, как pH, содержание ионов кальция, температура для максимально эффективного использования коагулянтов.

Способность эффективно осуществлять коагуляцию молочной смеси при значениях pH 6,5 на этапе внесения фермента – одно из главных требований к МФП при выработке сыра. Учитывая тот факт, что часть молокосвертывающего препарата всегда остается в сырном зерне, нужно понимать, какова активность коагулянта при значении pH около 5,5, которое характерно для сырной массы на этапе прессования, а также при pH около 5,0, то есть на пике развития микрофлоры в созревающих сырах.

Согласно результатам исследований, представленным в табл. 2 и на рис. 3, при приближении значений pH к 7,0 препараты рекомбинантного химозина инактивировались на 88–90%. При этом динамика изменения молокосвертывающей активности в изученном диапазоне отличалась. Препарат рекомбинантного химозина Maxiren 1800 сохранял более высокий уровень молокосвертывающей активности по сравнению с препаратом CHY-MAX.

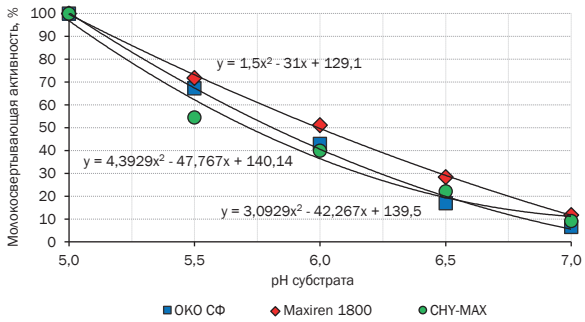

Рис. 3. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от pH молока

Fig. 3. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on the pH of milk

В России, согласно требованиям ТР ТС 033/2013, при выработке подавляющего количества сычужных сыров молоко подвергают пастеризации. В результате этого процесса происходит снижение количества несвязанных ионов кальция, что, в свою очередь, является причиной увеличения длительности сычужного свертывания пастеризованного молока. Чтобы не прибегать к увеличению количества вносимого коагулянта в качестве меры регулирования консистенции сыра в пастеризованное молоко вносят $CaCl_2$ из расчета 10–50 г/100 л. Реакция различных коагулянтов молока на увеличение количества вносимого хлористого кальция может отличаться. Следовательно, определение зависимости молокосвертывающей активности ферментного препарата от дозы вносимого в молочную смесь $CaCl_2$ является важной с точки зрения технологии сыроделия.

Получены данные о том, что с увеличением дозы вносимого $CaCl_2$ от 0 до 5 mM молокосвертывающая активность исследуемых препаратов возрастала. Наибольшую

Таблица 2. Влияние концентрации ионов водорода на молокосвертывающую активность препаратов рекомбинантного химозина

Table 2. Effect of hydrogen ions concentration on the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, %, при различных значениях pH в субстрате				
	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0
ОКО СФ	100	67,32±2,81	43,02±2,03	16,82±0,36	6,55±0,07
Maxiren 1800	100	71,74±4,54	50,91±0,01	28,31±1,19	11,63±0,31
CHY-MAX	100	54,55±0,01	37,50±0,01	24,00±0,01	9,14±0,09

Таблица 3. Влияние концентрации ионов кальция в молоке на молокосвертывающую активность препаратов рекомбинантного химозина

Table 3. Effect of calcium ions concentration in milk on the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, %, при различной концентрации $CaCl_2$					
	0 mM	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM
ОКО СФ	100	139,23±1,85	184,92±3,27	236,66±0,01	277,58±11,38	314,2±5,50
Maxiren 1800	100	150,03±4,25	199,96±0,01	239,96±0,01	295,18±9,33	321,58±11,46
CHY-MAX	100	146,82±0,01	208,23±12,34	257,23±12,14	313,72±10,60	342,57±0,01

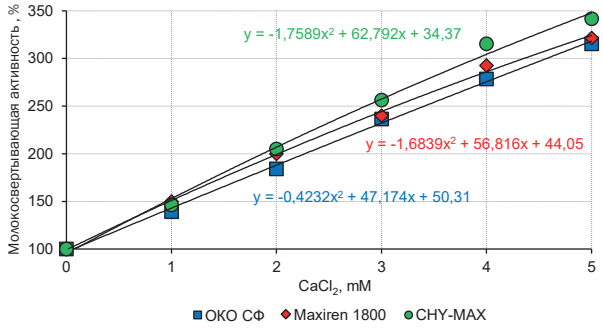

Рис. 4. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от концентрации Ca^{2+}

Fig. 4. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on Ca^{2+} concentration

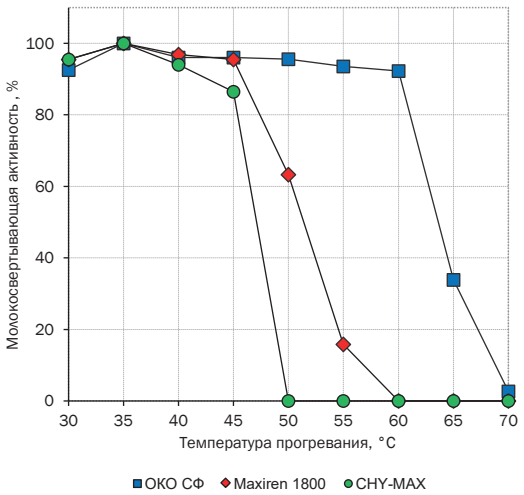

Рис. 5. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от температуры инкубирования фермента

Fig. 5. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on the enzyme incubation temperature

чувствительность при повышении содержания $CaCl_2$ в молоке на всех этапах исследования имел препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX (табл. 3, рис. 4). Препарат Maxiren 1800 имел показатели, близкие к значениям ОКО СФ.

Термостабильность – это возможность фермента избегать денатурации (необратимых изменений белковой структуры) при критических значениях температуры окружающей среды. При созревании сыра термостабильность МФП является одним из важных факторов, влияющих на интенсивность и направленность происходящих в нем протеолитических процессов. Остатки МФП в сырной массе вызывают неспецифичный протеолиз, так как субстратами для них становятся α- и β-казеины [18, 19]. При производстве сыров с высокой температурой второго нагревания (52–58 °C) и длительными сроками хранения в основном применяют термолабильные МФП [19]. И напротив, для производства сыров с чеддеризацией и термомеханической обработкой сырной массы должны использоваться термостабильные ферменты, сохраняющие протеолитическую активность при действии высоких температур (60–70 °C) [20].

В проведенных исследованиях за порог термостабильности МФП принималось значение температуры прогревания, при котором фермент терял 20% и более от исходной молокосвертывающей активности. Результаты исследования термостабильности препаратов рекомбинантного химозина представлены в табл. 4 и на рис. 5.

Термостабильность образцов рекомбинантного химозина была различной: при 50 °C препарат Maxiren 1800, достигнув порога термостабильности, сохранял около 63% от исходной молокосвертывающей активности, а препарат CHY-MAX при такой же температуре уже почти полностью терял активность и показывал лишь 0,5% от первоначальных значений. При этом пороги термостабильности генно-инженерных химозинов были одинаковыми (50 °C) (см. табл. 4, рис. 5). Порог термостабильности ОКО СФ наступал при температуре 65 °C, при 70 °C препарат сохранял только 2,67% от максимальной молокосвертывающей активности.

Таблица 4. Термостабильность препаратов рекомбинантного химозина

Table 4. Thermal stability of recombinant chymosin preparations

Наименование препарата	Остаточная молокосвертывающая активность, %, при различной температуре прогревания								
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C	65 °C	70 °C
ОКО СФ	92,50±1,47	100	96,56±0,01	96,56±0,01	95,63±0,91	93,38±1,75	92,31±2,27	34,02±0,20	2,67±0,05
Maxiren 1800	98,70±2,55	100	100,00±2,55	93,80±0,01	63,34±1,79	15,93±0,45	3,25±0,19	–	–
CHY-MAX	95,07±1,86	100	94,12±0,01	86,49±0,01	0,54±0,01	–	–	–	–

Таблица 5. Влияние температуры субстрата на молокосвертывающую активность молокосвертывающего ферментного препарата

Table 5. Effect of substrate temperature on the milk-converting activity of a milk-clotting enzyme preparation

Наименование препарата	Молокосвертывающая активность, %, при различной температуре субстрата						
	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C	50 °C	55 °C	60 °C
ОКО СФ	38,6±1,5	62,2±1,8	74,1±0,9	86,4±3,2	92,1±0,5	100	100
Maxiren 1800	33,3±1,6	47,2±2,2	60,3±1,2	77,3±1,3	89,5±2,9	100	90,0±4,5
CHY-MAX	31,6±0,9	47,2±2,4	59,9±2,3	78,3±2,4	100	100	60,7±3,7

T-оптимум является одной их общих биохимических характеристик молокосвертывающих ферментов, которая позволяет оценить молокосвертывающую активность на основных технологических этапах выработки сыра, связанных с изменением температуры от момента свертывания молока до стадий прессования и посолки[2] [9]. У препаратов рекомбинантного химозина CHY-MAX и Maxiren 1800 в диапазоне температур от 30 до 45 °C наблюдалась одинаковая молокосвертывающая активность (табл. 5, рис. 6).

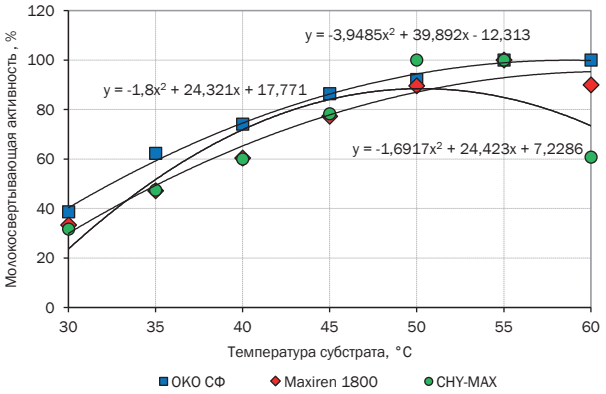

Рис. 6. Динамика изменения молокосвертывающей активности препаратов рекомбинантного химозина в зависимости от температуры субстрата

Fig. 6. Change in the milk-clotting activity of recombinant chymosin preparations depending on the substrate temperature

T-оптимум для CHY-MAX наступал при достижении 50 °C, максимальная активность сохранялась в интервале 50–55 °C. При температуре 60 °C молокосвертывающий фермент оказался за порогом *T*-оптимума, так как сохранял менее 80% (около 60,7%) от максимальной молокосвертывающей активности. *T*-оптимум для Maxiren 1800 наступал при достижении 55 °C, при температуре 60 °C молокосвертывающий фермент потерял только 10% активности, что коррелирует с более высокой термостабильностью этого варианта химозина. При этом препарат ОКО СФ сохранял высокую молокосвертывающую активность при максимальной температуре прогревания субстрата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX имел сопоставимую с ОКО СФ протеолетическую активность. У препарата Maxiren 1800 протеолетическая активность была несколько выше.

2. При pH 7,0 препараты рекомбинантного химозина инактивировались на 88–90%. Динамика изменения молокосвертывающей активности в диапазоне pH от 5,0 до 7,0 отличалась. Препарат рекомбинантного химозина Maxiren 1800 сохранял более высокий уровень молокосвертывающей активности по сравнению с препаратом CHY-MAX.

3. С увеличением дозы вносимого $CaCl_2$ с 0 до 5 mM молокосвертывающая активность исследуемых препаратов возрастала. Препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX имел наибольшую чувствительность к увеличению концентрации ионов Ca^{2+}. Молокосвертывающая активность препарата Maxiren 1800 была близка к значениям молокосвертывающей активности ОКО СФ.

4. Термостабильность препаратов рекомбинантного химозина была различной: при 50 °C препарат Maxiren 1800, достигнув порога термостабильности, сохранял около 63% от исходной молокосвертывающей активности, а препарат CHY-MAX при такой же температуре уже почти полностью терял активность и показывал лишь 0,5% от первоначальных значений. При этом пороги термостабильности исследованных препаратов рекомбинантного химозина были одинаковыми (50 °C).

5. *T*-оптимум для CHY-MAX наступал при достижении 50 °C, для Maxiren 1800 – 55 °C. При температуре 60 °C CHY-MAX достиг порога *T*-оптимума (сохранил около 60% от максимального уровня молокосвертывающей активности), а Maxiren 1800 потерял только 10% активности. При температуре 50–55 °C значения молокосвертывающей активности препарата Maxiren 1800 были близки к значениям молокосвертывающей активности ОКО.

Качество готового продукта в значительной степени зависит от выбора применяемых при выработке сыра МФП. Правильный выбор фермента с необходимыми технологическими свойствами, из которых протеолитическая активность является одним из важнейших, поможет предприятиям производить продукцию высокого качества и увеличить выход сыра. Препараты исследуемых коммерческих образцов рекомбинантного химозина по биохимическим свойствам близки к ОКО СФ, что позволяет применять их в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания, для которых по классической технологии применяется сычужный фермент.

В России генно-инженерные химозины не производятся. В связи с этим проведенные исследования по разработке технологии получения препаратов отечественного рекомбинантного химозина являются актуальными, а их применение имеет большую практическую значимость.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Мусина О.Н., Гришкова А.В., Просеков А.Ю. К вопросу о самообеспеченности страны молокосвертывающими ферментами // Молочная промышленность. 2024. N 1. С. 24–27. DOI: 10.21603/1019-8946-2024-1-10. EDN: KINKYI.

2. Свириденко Г.М. Требования к бактериальным заквасками для производства ферментируемых молочных продуктов // Сыроделие и маслоделие. 2014. N 4. С. 24–27. EDN: SJDTGT.

3. Абрамов Д.В., Мягконосов Д.С., Делицкая И.Н., Мордвинова В.А., Муничева Т.Э., Овчинникова Е.Г. Перспективы применения комплексных МФП для производства созревающих сычужных сыров // Сыроделие и маслоделие. 2019. N 1. С. 24–26. DOI: 10.31515/2073-4018-2019-1-24-26. EDN: YYIIWT.

4. Абрамов Д.В., Мягконосов Д.С., Мордвинова В.А., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Современные тенденции рынка молокосвертывающих ферментных препаратов // Сыроделие и маслоделие. 2018. N 6. С. 7–11. EDN: YZKXZR.

5. Мягконосов Д.С., Абрамов Д.В., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Протеолитическая активность молокосвертывающих ферментов разного происхождения // Пищевые системы. 2022. Т. 5. N 1. P. 47–54. DOI: 10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54. EDN: FKAOJB.

6. Nestorovski T., Velkoska – Markovska L., Srbinovska S., Miskoska – Milevska E., Petanovska – Ilievska B., Popovski Z.T. Different approaches in analyzing chymosin purity // Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences. 2019. Vol. 73, no. 3. P. 24–29. DOI: 10.55302/JAFES19733024n.

7. Курбанова, М.Г., Бондарчук О.Н., Масленникова С.М. Практические аспекты гидролиза казеина молока эндопептидазами // Техника и технология пищевых производств. 2013. N 2. С. 34–39. EDN: QANQOF.

8. Илларионова Е.Е., Кручинин А.Г., Калугина Д.Н., Туровская С.Н. Исследование воздействия молокосвертывающих ферментов различного происхождения на формирование молочных сгустков // Пищевая промышленность. 2021. N 9. С. 27–29. DOI: 10.52653/PPI.2021.9.9.008. EDN: HPZWKT.

9. Кручинин А.Г., Илларионова Е.Е. Сравнение структурно-механических характеристик ферментированных молочных концентратов // Вестник КрасГАУ. 2022. N 3. С. 162–170. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-3-162-170. EDN: SNYSSA.

10. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Chapoval A.I., Esina T.I., Elchaninov V.V. The effect of thioredoxin and prochymosin coexpression on the refolding of recombinant alpaca chymosin // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 27. N 4. С. 421–427. DOI: 10.18699/VJGB-23-50. EDN: CCPBRD.

11. Hayat S.M.G., Farahani N., Golichenari B., Sahebkar A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know // Current Pharmaceutical Design. 2018. Vol. 24, no. 6. P. 718–725. DOI: 10.2174/1381612824666180131121940.

12. Рудометов А.П., Беленькая С.В., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Ельчанинов В.В. Исследование ферментативной стабильности жидких препаратов рекомбинантного химозина коровы (*Bos taurus taurus* L) // Сыроделие и маслоделие. 2017. N 6. С. 40–43. EDN: ZUDMCR.

13. Мягконосов Д.С., Абрамов Д.В., Делицкая И.Н., Овчинникова Е.Г. Протеолитическая активность молокосвертывающих ферментов разного происхождения // Пищевые системы. 2022. Т. 5. N 1. С. 47–54. DOI: 10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54. EDN: FKAOJB.

14. Sankar P.L., Cho M.K. Engineering values into genetic engineering: a proposed analytic framework for scientific social responsibility // The American Journal of Bioethics. 2015. Vol. 15, no. 12. P. 18–24. DOI: 10.1080/15265161.2015.1104169.

15. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Short communication: a comparative analysis of recombinant chymosins // Journal of Dairy Science. 2012. Vol. 95, no. 2. P. 609–613. DOI: 10.3168/jds.2011-4445.

16. Каверзнева Е.Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз // Прикладная биохимия и микробиология. 1971. Т. 7. N 2. С. 225–228.

17. Пат. № 2670071, Российская Федерация, МПК C12N 15/00. Рекомбинантная плазмида pET21a-ProChym, обеспечивающая синтез химерного белка прохимозина B Bos taurus, и штамм *Eschrichia coli* BL21(DE3)pLysE pET21a-ProChym – продуцент химерного белка прохимозина B Bos taurus / Д.Н. Щербаков, А.П. Рудометов, В.В. Ельчанинов, С.В. Беленькая, А.В. Кригер, А.А. Ильичев. Заявл. 03.07.2017; опубл. 17.10.2018. Бюл. № 29.

18. Taheri-Kafrani A., Kharazmi S., Nasrollahzadeh M., Soozanipour A., Ejeian F., Etedali P., et al. Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2021. Vol. 61, no. 19. P. 3160–3196. DOI: 10.1080/10408398.2020.1793726.

19. Лепилкина О.В., Григорьева А.И. Ферментативный протеолиз при преобразовании молока в сыр // Пищевые системы. 2023. Т. 6. N 1. С. 36–45. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45. EDN: MYSJFF.

20. Димитров В.Г. Особенности производства сыров типа «Моцарелла» // Сыроделие и маслоделие. 2016. N 2. С. 34–35. EDN: VQDGUN.

REFERENCES

1. Musina O.N., Grishkova A.V., Prosekov A.Yu. Domestic self-sufficiency in milk-converting enzymes. *Dairy Industry*. 2024;1:24-27. (In Russian). DOI: 10.21603/1019-8946-2024-1-10. EDN: KINKYI.

2. Sviridenko G.M. Requirements to the bacterial starters for fermented milk products manufacturing. *Cheesemaking and buttermaking*. 2014;4:24-27. (In Russian). EDN: SJDTGT.

3. Abramov D.V., Myagkonosov D.S., Delitskaya I.N., Mordvinova V.A., Municheva T.E., Ovchinnikova E.G. Perspectives of using complex milk-clotting enzyme preparations for ripening rennet cheeses production. *Cheesemaking and buttermaking*. 2019;1:24-26. (In Russian). DOI: 10.31515/2073-4018-2019-1-24-26. EDN: YYIIWT.

4. Abramov D.V., Myagkonosov D.S., Mordvinova V.A., Delitskaya I.N., Ovchinnikova E.G. Current market trends of milk-coagulating enzyme preparations. *Cheesemaking and buttermaking*. 2018;6:7-11. (In Russian). EDN: YZKXZR.

5. 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: FKAOJB.

6. Nestorovski T., Velkoska – Markovska L., Srbinovska S., Miskoska – Milevska E., Petanovska – Ilievska B., Popovski Z.T. Different approaches in analyzing chymosin purity. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*. 2019;73(3):24-29. DOI: 10.55302/JAFES19733024n.

7. Kurbanova M.G., Bondarchuk O.N., Maslennikova S.M. Practical aspects of hydrolysis of milk casein by endopeptidases. *Food Processing: Techniques and Technology*. 2013;2:34-39. (In Russian). EDN: QANQOF.

8. Illarionova E.E., Kruchinin A.G., Kalugina D.N., Turovskaya S.N. The research on the effect of the milk-clotting ferments of different origin on the milk clots formation. *Food Industry*. 2021;9:27-29. (In Russian). DOI: 10.52653/PPI.2021.9.9.008. EDN: HPZWKT.

9. Kruchinin A.G., Illarionova E.E. Fermented milk concentrates structural and mechanical characteristics comparison. *Bulletin of KSAU*. 2022;3:162-170. (In Russian). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-3-162-170. EDN: SNYSSA.

10. Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Chapoval A.I., Esina T.I., Elchaninov V.V. The effect of thioredoxin and prochymosin coexpression on the refolding of recombinant alpaca chymosin. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;27(4):421-427. DOI: 10.18699/VJGB-23-50.EDN: CCPBRD.

11. Hayat S.M.G., Farahani N., Golichenari B., Sahebkar A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. *Current Pharmaceutical Design*. 2018;24(6):718-725. DOI: 10.2174/1381612824666180131121940.

12. Rudometov A.P., Belenkaya S.V., Shcherbakov D.N., Balabova D.V., Krieger A.V., Elchaninov V.V. Study of enzymatic stability of the liquid preparations of the recombinant bovine (*Bos taurus taurus* L.) chymosin. *Cheesemaking and buttermaking*. 2017;6:40-43. (In Russian). EDN: ZUDMCR.

13. 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: FKAOJB.

14. Sankar P.L., Cho M.K. Engineering values into genetic engineering: a proposed analytic framework for scientific social responsibility. *The American Journal of Bioethics*. 2015;15(12):18-24. DOI: 10.1080/15265161.2015.1104169.

15. Vallejo J.A., Ageitos J.M., Poza M., Villa T.G. Short communication: a comparative analysis of recombinant chymosins. *Journal of Dairy Science*. 2012;95(2):609-613. DOI: 10.3168/jds.2011-4445.

16. Kaverzneva E.D. Standard method for determining proteolytic activity for complex protease preparations. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 1971;7(2):225-228. (In Russian).

17. Shcherbakov D.N., Rudometov A.P., Elchaninov V.V., Belenkaya S.V., Kriger A.V., Ilichev A.A. *pET21a-ProChym recombinate plasmid, providing synthesis of chemeric B Bos taurus proximosin protein, as well as Escherichia coli BL21(DE3)pLysE pET21a-ProChym – producer of chemeric B Bos taurus proximosin protein*. Patent RF, no. 2670071; 2018. (In Russian).

18. Taheri-Kafrani A., Kharazmi S., Nasrollahzadeh M., Soozanipour A., Ejeian F., Etedali P., et al. Recent developments in enzyme immobilization technology for high-throughput processing in food industries. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2021;61(19):3160-3196. DOI: 10.1080/10408398.2020.1793726.

19. 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.

20. Dimitrov B.G. Special issues of “Mozarella” type cheeses manufacturing. *Cheesemaking and buttermaking*. 2016;2:34-35. (In Russian). EDN: VQDGUN.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Гришкова Анастасия Викторовна,
к.т.н., доцент,
старший научный сотрудник,
Федеральный Алтайский научный
центр агробиотехнологий,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,
доцент,
Алтайский государственный
медицинский университет,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40,
Российская Федерация,
старший научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
✉ anastasiya-kriger@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0003-1117-0489

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Anastasiya V. Grishkova,
Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Senior Researcher,
Federal Altai Scientific
Center for Agrobiotechnology,
66, Sovetskoi Armii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,
Associate Professor,
Altai State Medical University,
40, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
Senior Researcher,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
✉ anastasiya-kriger@yandex.ru
https://orcid.org/0000-0003-1117-0489

Белов Александр Николаевич,
к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральный Алтайский научный
центр агробиотехнологий,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,
beloffan@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0003-4045-2493

Коваль Анатолий Дмитриевич,
к.т.н., ведущий научный сотрудник,
Федеральный Алтайский научный
центр агробиотехнологий,
656016, г. Барнаул, ул. Советской армии, 66,
Российская Федерация,
anatokoval@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0001-7832-7159

Стурова Юлия Геннадьевна,
к.т.н., доцент, старший научный сотрудник,
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

Мусина Ольга Николаевна,
д.т.н., доцент, главный научный сотрудник,
Алтайский государственный технический
университет им. И.И. Ползунова,
656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 46,
Российская Федерация,
musinaolga@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-4938-8136

Alexander N. Belov,
Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher,
Federal Altai Scientific
Center for Agrobiotechnology,
66, Sovetskoi Armii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,
beloffan@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0003-4045-2493

Anatoliy D. Koval,
Cand. Sci. (Engineering), Leading Researcher,
Federal Altai Scientific
Center for Agrobiotechnology,
66, Sovetskoi Armyii St., Barnaul, 656016,
Russian Federation,
anatokoval@yandex.ru,
https://orcid.org/0000-0001-7832-7159

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

Olga N. Musina,
Dr. Sci. (Engineering), Associate Professor,
Chief Researcher,
Polzunov Altai State Technical University,
46, Lenin Ave., Barnaul, 656038,
Russian Federation,
musinaolga@gmail.com
https://orcid.org/0000-0002-4938-8136

Вклад авторов

А.В. Гришкова – разработка концепции, разработка методологии, формальный анализ, проведение исследования, валидация результатов, визуализация, написание черновика рукописи.
А.Н. Белов – научное руководство, валидация результатов.
А.Д. Коваль – валидация результатов, написание черновика рукописи.
Ю.Г. Стурова – формальный анализ, валидация результатов, визуализация, редактирование рукописи.
О.Н. Мусина – получение финансирования.

Contribution of the authors

Anastasiya V. Grishkova – conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, validation, visualization, writing – original draft.
Alexander N. Belov – supervision, validation.
Anatoliy D. Koval – validation, writing – original draft.
Yuliay G. Sturova – formal analysis, validation, visualization, editing.
Olga N. Musina – funding acquisition.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Conflict of interest

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.

Информация о статье

Поступила в редакцию 18.12.2024
Одобрена после рецензирования 03.03.2025.
Принята к публикации 31.05.2025.

Information about the article

The article was submitted 18.12.2024
Approved after reviewing 03.03.2025.
Accepted for publication 31.05.2025.