

# Технологические свойства препаратов сычужного фермента

**Анастасия Викторовна Гришкова**<sup>1,2</sup>, канд. техн. наук, старший научный сотрудник<sup>1</sup>, доцент<sup>2</sup>  
E-mail: anastasiya-kriger@yandex.ru

**Александр Юрьевич Просеков**<sup>3</sup>, д-р техн. наук, д-р биол. наук, главный научный сотрудник  
**Анатолий Дмитриевич Коваль**<sup>1</sup>, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник

<sup>1</sup>Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, отдел Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул

<sup>2</sup>Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

<sup>3</sup>Кемеровский государственный университет, Кемерово

Качество готового сыра определяется всеми этапами его выработки, но основой сыроделия является получение молочного сгустка под действием молокосвертывающего фермента. Продолжительность свертывания и структурно-механические свойства сырного сгустка – критически важные показатели, влияющие на выход сыра, консистенцию, рисунок, вкус. На практике необходимо учитывать, что коагулирующая способность фермента может варьировать в зависимости от свойств подготовленной для свертывания молочной смеси (содержания белка, минеральных солей, кислотности, температуры). В работе исследованы основные технологические характеристики препаратов сычужного фермента (протеолитическая активность, качественный состав, чувствительность к ионам Ca<sup>2+</sup>, pH, термостабильность), важные для регулирования процесса коагуляции. Даны практические рекомендации по применению молокосвертывающих ферментных препаратов.

**Ключевые слова:** сычужный фермент, специфическая и неспецифическая активность, чувствительность к ионам Ca<sup>2+</sup> и pH, термостабильность

Продолжительность свертывания и структурно-механические свойства сырного сгустка – критически важные показатели, от которых зависят содержание влаги в сыре, его активная кислотность, динамика проникновения соли в сырную массу, выход сыра, структура, консистенция, рисунок и другие показатели, характеризующие качество сыра.

Большинство видов сыров могут быть выработаны с использованием всего спектра молочных коагулянтов, представленных на рынке. Однако различия в протеолитической специфике у разных коагулянтов могут привести к получению некоторых различий в консистенции и вкусе сыров [1]. Все традиционные технологии производства сыра отработывались под сычужный фермент. Подбор заквасок также осуществлялся с учетом их взаимодействия с сычужным ферментом. Большинство протеолитических ферментов молочнокислых бактерий индуцированные, т. е. синтезируются в клетке в зависимости от присутствия определенного субстрата. Поэтому они не всегда в состоянии расщепить многие полипептидные цепи, образованные молокосвертывающими ферментными препаратами (МФП), отличающимися по составу от сычужного фермента [2, 3, 4, 5].

Важность сычужного фермента обусловлена его участием в процессах свертывания и созревания. В связи с этим выделяют специфическую и неспецифическую активности фермента.

**Специфическая или молокосвертывающая активность** – это способность химозина и пепсина гидролизовать ключевую пептидную связь 105 (Phe) – 106 (Met) в молекуле *κ*-казеина. Химозин гидролизует в основном ключевую пептидную связь, поскольку синтезируется в желудке теленка для обеспечения свертывания молока, в то время как пепсины атакуют большое количество пептидных связей, обеспечивая распад белков, поступающих с твердыми кормами.

Более низкая общая протеолитическая активность химозина по сравнению с пепсинами имеет важное физиологическое значение, поскольку новорожденные в первый период жизни нуждаются в нативных иммуноглобулинах молозива для защиты от инфекций, не имея собственных защитных систем [6].

**Неспецифическая или протеолитическая активность** направлена на расщепление прочих пептидных связей и приводит к гидролизу белка до относительно мелких белковых фрагментов – пептидов.

Химозин расщепляет казеин с образованием крупных фрагментов с молекулярной массой до 16 Kd. Пепсин обладает гораздо более высокой протеолитической активностью. Увеличение в сычужном ферменте относительного содержания пепсина приводит к образованию более рыхлого сгустка при свёртывании молока, что сопровождается снижением выхода сыра за счет потерь белка и жира с сывороткой [2]. Для проявления этой активности очень важен ферментный состав препарата.

Знание особенностей технологических характеристик МФП является бесприоритетным инструментом в руках технолога сыродельного производства для получения продукта высокого качества и вектором для получения большей прибыли сыродельным предприятием. На сегодняшний день на отечественном рынке представлен большой перечень МФП отечественных и зарубежных производителей, несмотря на давление, оказываемое санкционной политикой стран Евросоюза. Очень часто ферменты применяются без учета особенностей сырьевой зоны, ассортимента выпускаемой продукции, свойств самих препаратов. В связи с этим проведенные исследования являются актуальными.

Цель работы – исследование основных технологических характеристик препаратов сычужного фермента, широко применяемых на сыродельных предприятиях Алтайского края.

Исследования проводились в лаборатории биохимии молока и молочных продуктов отдела СибНИИ сыроделия ФГБНУ ФАНЦА. В качестве эталонного образца сравнения применяли «Отраслевой контрольный образец сычужного фермента» (ОКО СФ) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента». Исследованы сычужный фермент производства ОАО «Московский завод сычужного фермента» (СФ) и сычужный препарат «Calf rennet Clerici 70/30» компании Caglificio Clerici SPA (Clerici 70/30).

Абсолютную молокосвёртывающую активность и соотношение активности пепсина и химозина определяли по ОСТ 10 288-2001, протеолитическую активность – по методу Каверзневой [7]. Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «ЧДА» или «ХЧ».

**Подготовка молокосвёртывающих ферментных препаратов (МФП).** Готовили 1 % 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.

**Исследование влияния концентрации хлористого кальция на молокосвёртывающую активность.** В молоко коровье пастеризованное с массовой долей жира 3,2 % вносили натрия азид ( $\text{NaN}_3$ ) до конечной концентрации 0,02 %. Измеряли pH молока и при необходимости доводили его значение до 6,5 путем внесения 2,0 М соляной кислоты. Подготовленное таким образом молоко хранили в пластиковой таре при температуре 5–8 °С и использовали для исследований в течение нескольких часов.

Далее в шесть мерных колб объемом 50 мл вносили 0,5 М раствор  $\text{CaCl}_2$  и дистиллированную воду по схеме: № 1 – 0,0 мл 0,5 М  $\text{CaCl}_2$  + 0,5 мл дистиллированной воды; № 2 – 0,1 мл 0,5 М  $\text{CaCl}_2$  + 0,4 мл дистиллированной воды; № 3 – 0,2 мл 0,5 М  $\text{CaCl}_2$  + 0,3 мл дистиллированной воды; № 4 – 0,3 мл 0,5 М  $\text{CaCl}_2$  + 0,2 мл дистиллированной воды; № 5 – 0,4 мл 0,5 М  $\text{CaCl}_2$  + 0,1 мл дистиллированной воды; № 6 – 0,5 мл 0,5 М  $\text{CaCl}_2$  + 0,0 мл дистиллированной воды и доводили объем молоком до 50 мл. Конечная концентрация внесенного хлористого кальция в колбах составляла: № 1 – 0,0 мМ, № 2 – 1,0 мМ, № 3 – 2,0 мМ, № 4 – 3,0 мМ, № 5 – 4,0 мМ, № 6 – 5,0 мМ. Подготовленные образцы молока с внесённым хлористым кальцием хранили при 5–8 °С и использовали для исследований в течение нескольких часов.

**Исследование влияния pH молока на молокосвёртывающую активность. Подготовка молока.** В молоко коровье пастеризованное с массовой долей жира 3,2 % вносили натрия азид ( $\text{NaN}_3$ ) до конечной концентрации 0,02 %. В шесть пластиковых стаканов вносили по 50 мл молока, нагревали до температуры 20–22 °С и титровали 2,0 М  $\text{HCl}$  или 1,0 М  $\text{NaOH}$  для получения шести образцов со значениями pH: 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0. Подготовленные образцы молока хранили при 5–8 °С и использовали для исследований в течение нескольких часов.

**Термостабильность МФП** определяли путем контроля изменения их молокосвёртывающей активности после прогревания в течение 30 мин при заданной температуре. Готовили 1 % растворы сухих МФП, прогревали в течение 30 мин на водяной бане в диапазоне температур от 30 до 70 °С с интервалом 5 °С, быстро охлаждали до комнатной температуры и определяли **молокосвёртывающую активность**.

При определении термостабильности порогом термоинактивации считали температуру прогревания, при которой исследуемый МФП терял  $\geq 20\%$  от исходной **молокозвертывающей активности**.

Результаты исследования протеолитической активности спектрофотометрическим методом представлены на рисунке 1. Как видим, протеолитическая активность эталонного образца ОКО СФ оказалась ниже активности опытных образцов сычужного препарата. Это, вероятно, объясняется тем, что ОКО СФ содержал в качестве примеси только 8 % говяжьего пепсина, что меньше по сравнению с СФ и Clerici 70/30, в состав которых соответственно входило 10,1 и 27,6 % говяжьего пепсина (рис. 2). При повышении содержания пепсиновой составляющей наблюдается рост неспецифического протеолиза (рис. 1).

**Влияние концентрации хлористого кальция на молокозвертывающую активность.** Для производства большинства видов сыров используется пастеризованное молоко. Повышение температуры во время пастеризации приводит к снижению растворимости фосфатов кальция и их необратимой преципитации в форме  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . В результате снижения концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке происходит появление дополнительного отрицательного заряда мицелл казеина и их дополнительная электростатическая стабилизация, что значительно ухудшает его коагуляционные свойства. На практике это сопровождается увеличением продолжительности образования сычужного сгустка. Чтобы нивелировать этот процесс, в пастеризованное молоко вносят  $\text{CaCl}_2$  из расчета 0,1–0,5 г/л. Это вызывает частичное снятие отрицательного заряда мицелл, что облег-

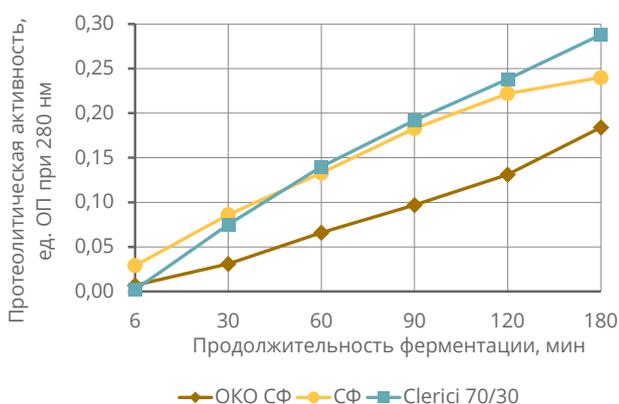


Рисунок 1. Протеолитическая активность образцов сычужного фермента

чает их сближение во вторичной (неферментативной) фазе свертывания и формирование трехмерной сетки молочного сгустка. В результате продолжительность свертывания молока сокращается [8, 9].

Графики зависимости времени образования сгустка от концентрации хлористого кальция в молочном субстрате, полученные для коммерческих молокозвертывающих ферментных препаратов (МФП), представлены на рисунке 3.

При внесении в пастеризованное молоко ионов кальция время его свертывания под действием исследуемых МФП уменьшается (рис. 3). Это указывает на снижение отрицательного заряда на мицелле казеина, что хорошо согласуется с литературными данными [9]. Наибольшую чувствительность к увеличению концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке показал препарат Clerici 70/30. Зависимости продолжительности коагуляции от концентрации  $\text{CaCl}_2$  в молоке, полученные для СФ и ОКО СФ, оказались близки. При повышении концентрации хлорида кальция до 4–5 мМ специфическая (а следовательно, протеолитическая) активность Clerici 70/30 возрастает на 11,7–16,1 % быстрее, чем **молокозвертывающая активность** ОКО СФ и СФ.

**Влияние pH молока на молокозвертывающую активность.** Существенным фактором, влияющим на активность МФП, является pH среды. Повышенная кислотность положительно влияет не только на активность фермента, но и на физико-химическое состояние казеина. При снижении pH молока происходит снижение отрицательного заряда казеинов (по мере приближения pH к значениям pI этих белков) [4, 10]. В то же время при защелачивании

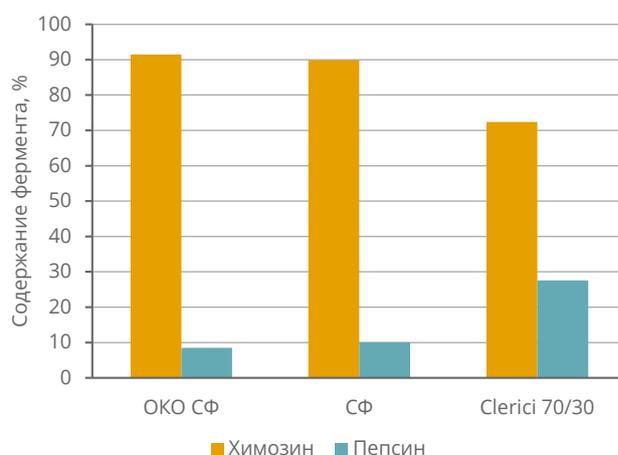


Рисунок 2. Качественный состав натуральных МФП

молока отрицательные поверхностные заряды мицелл казеина растут, а вместе с ними растут и силы межмицеллярного отталкивания. В результате скорость коагуляции молока снижается.

Для подготовки молока к выработке сыра вносят заквасочную микрофлору, под воздействием которой происходит сбраживание лактозы с образованием молочной кислоты. В результате этого на этапе добавления ферментного препарата рН молока снижается до значения 6,4–6,5.

При этом известно, что уровень активной кислотности среды для проявления максимальной активности химозина должен быть близок к 5,0 ед. рН, пепсина – в диапазоне рН от 3,0 до 4,5 [4, 11]. В связи с этим одним из требований к технологическим молокосвертывающим ферментам является способность эффективно коагулировать молоко при значениях рН, лежащих за пределами рН-оптимума фермента [3]. Влияние концентрации ионов водорода на продолжительность свертывания молока показано на рисунке 4.

Рассмотренный диапазон рН важен с точки зрения технологии сыродельного производства (от момента внесения МФП в смесь для выработки сыра до процесса созревания продукта). Согласно нашим результатам исследований, специфическая активность ОКО СФ на уровне рН 5,5, соответствующем активной кислотности в сырах после прессования, выше на 11 % по сравнению с коммерческими образцами исследуемых ферментных препаратов (рис. 4). В целом исследуемые молокосвертывающие ферментные препараты в изученном диапазоне рН имели близкие показатели зависимости продолжительности свертывания молока. Это позволяет утвер-

ждать, что по данному технологическому показателю исследуемые МФП соответствуют требованиям, предъявляемым в сыроделии к коагулянтам молока.

**Термостабильность.** Диапазон температур, при котором сохраняется активность фермента, называется термостабильностью. Этот показатель является одним из регуляторов уровня протеолиза при созревании сыра. МФП, остающиеся в сырной массе, влияют на неспецифичный протеолиз, так как для них субстратами становятся  $\alpha$ - и  $\beta$ -казеины [4, 12, 13]. Термолабильные МФП, имеющие низкий порог термоинактивации, используются в основном при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания (52–58 °С) и длительными сроками хранения. В то время как для сыров с короткими сроками созревания и хранения допускается использование термостабильных коагулянтов молока с высоким порогом термоинактивации. Порогом термостабильности МФП считается температура, при которой фермент сохраняет не менее 80 % от исходной молокосвертывающей активности.

На рисунке 5 представлены результаты исследования термостабильности контрольных растворов ферментных препаратов. Термостабильность исследуемых препаратов снижается в ряду: ОКО СФ, СФ, Clerici 70/30. Динамика снижения **молокосвертывающей активности** исследуемых МФП различна. Пороговой точкой для ОКО СФ и СФ является температура 60 °С, после чего происходит быстрая потеря активности. Препарат сычужного фермента Clerici 70/30 при 45 °С терял 45,9 % активности (порог термоинактивации), при 50 °С – 67,9 % активности, инактивация фермента наступала при 55 °С, что указывает на его термолабильность.

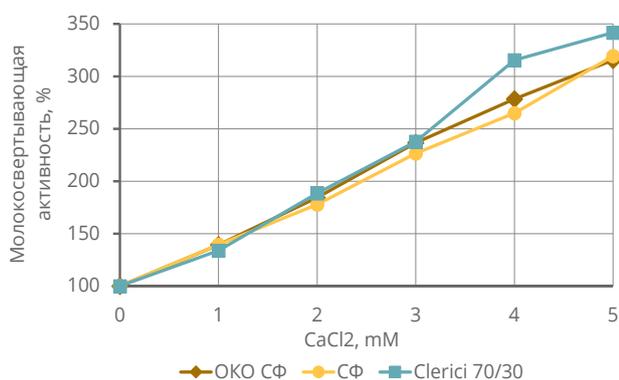


Рисунок 3. Влияние концентрации ионов кальция Ca<sup>2+</sup> в молоке на молокосвертывающую активность ферментных препаратов

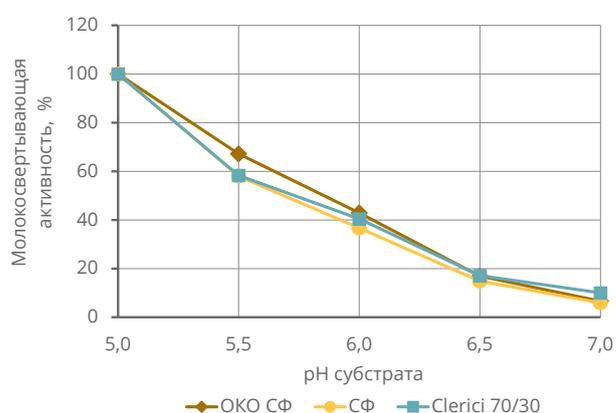


Рисунок 4. Влияние pH молока на молокосвертывающую активность ферментных препаратов

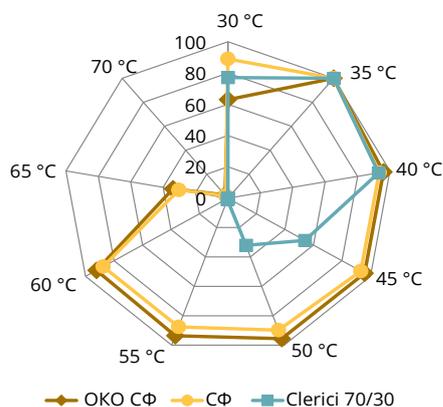


Рисунок 5. Термостабильность образцов сычужного фермента

Исследования молокосвертывающих ферментных препаратов показали, что препараты сычужного фермента обладают низкой неспецифической активностью. Содержание пепсина в коммерческих образцах сычужного фермента соответствует

декларируемому производителем уровню. Наибольшую чувствительность к увеличению концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке показал препарат Clerici 70/30. Положительной характеристикой отечественного сычужного фермента является его меньшая чувствительность к этому показателю, так как появляется возможность варьировать количество вносимого хлорида кальция и таким образом нивелировать риск развития избыточной протеолитической активности. Показатели зависимости продолжительности свертывания молока при различных значениях pH в диапазоне 5,0–7,0 у всех исследуемых препаратов оказались близки и находились в соответствии с требованиями, предъявляемыми в сыроделии к коагулянтам молока. Наибольшая термостабильность обнаружена у препарата Clerici 70/30, что позволяет применять его в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания и длительными сроками хранения. ■

### The main technological properties of rennet enzyme preparations

Grishkova A. V.<sup>1,2</sup>, Prosekov A. Yu.<sup>3</sup>, Koval A. D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul

<sup>2</sup>Altai State Medical University, Barnaul

<sup>3</sup>Kemerovo State University, Kemerovo

The quality of the finished cheese is determined by all stages of its production, but the basis of cheese making is the production of a milk clot under the action of a milk-converting enzyme. The duration of coagulation and the structural and mechanical properties of the cheese clot are critical indicators that affect the yield of cheese, consistency, pattern, taste. In practice, it is necessary to take into account that the coagulating ability of the enzyme may vary depending on the properties of the milk mixture prepared for coagulation (protein content, mineral salts, acidity, temperature). The main technological characteristics of rennet enzyme preparations (proteolytic activity, qualitative composition, sensitivity to Ca ions, pH, thermal stability), important for the regulation of the coagulation process, have been studied. Practical recommendations on the use of milk-clotting enzyme preparations are given.

**Key words:** rennet enzyme, specific and non-specific activity, sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  ions and pH, thermal stability

### Список литературы

- Абрамов, Д. В. Перспективы применения комплексных МФП для производства созревающих сычужных сыров / Д. В. Абрамов [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2019. № 1. С. 24–26.
- Белов, А. Н. Молокоосвертывающие препараты / А. Н. Белов, В. В. Ельчанинов, А. Д. Коваль // Сыроделие и маслоделие. 2004. № 1. С. 14–16.
- Ельчанинов, В. В. Краткая ретроспектива применения и изучения молокоосвертывающих ферментов / В. В. Ельчанинов // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 5. С. 26–28.
- Ельчанинов, В. В. Исследование молокоосвертывающего фермента из сычужков северных оленей: дис...канд.техн.наук: 05.18.04: защищена 23.01.06 / Ельчанинов Вадим Валентинович. – Кемерово, 2006. – 172 с.
- Мурунова, Г. В. Принцип подбора молокоосвертывающего фермента для производства сыра / Г. В. Мурунова, Ю. Я. Свириденко // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 5. С. 2–4.
- Гудков, А. В. Тенденции в развитии сыроделия / А. В. Гудков // Молочная промышленность. 1987. № 4. С. 29–33.
- Каверзнева, Е. Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз /

Е. Д. Каверзнева // Прикладная биохимия и микробиология. 1971. Т. VII. Вып. 2. С. 225–228.

8. Майоров, А. А. Проблемы повышения выхода сыра / А. А. Майоров, И. М. Мироненко, А. А. Байбикова // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 2. С. 19–23.

9. Осинцев, А. М. Теоретическое и экспериментальное исследование процессов, лежащих в основе свертывания молока / А. М. Осинцев // Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. Кемерово, 2003. 120 с.

10. Lucey, J. A. Formation and physical properties of milk protein gels / J. A. Lucey // Journal of Dairy Science. 2002. № 85. P. 281–294.

11. Тёплы, М. Молокоосвертывающие ферменты животного и микробного происхождения / М. Тёплы, Я. Машек, Я. Гавлова. – М.: Пищевая промышленность. 1980. 272 с.

12. Gaiaschi, A. Proteolysis of  $\alpha_s$ -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening / A. Gaiaschi [et al.] // Journal of Dairy Science. 2000. № 83. P. 2733–2739.

13. Gaiaschi, A. Proteolysis of  $\beta$ -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening / A. Gaiaschi [et al.] // Journal of Dairy Science. 2001. № 84. P. 60–65.