

# Основные технологические свойства заменителей сычужного фермента

**Анастасия Викторовна Гришкова**<sup>1, 2</sup>, канд. техн. наук, старший научный сотрудник, доцент

E-mail: anastasiya-kriger@yandex.ru

**Александр Николаевич Белов**<sup>1</sup>, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник

**Александр Юрьевич Просеков**<sup>3</sup>, д-р техн. наук, д-р биол. наук, ректор

**Анна Владимировна Миронова**<sup>1</sup>, младший научный сотрудник

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

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

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

От процесса получения молочного сгустка под действием молокосвертывающего фермента зависит качество готового сыра. Большинство видов сыров могут вырабатываться с использованием всего спектра молочных коагулянтов, представленных на рынке. Однако, не учитывая их технологические особенности, предприятия экономят на стоимости ферментов, но теряют на качестве продукции. Исследованы основные технологические характеристики заменителей сычужного фермента (протеолитическая активность, чувствительность к ионам  $Ca^{2+}$ , pH, термостабильность), важные для регулирования процесса коагуляции во время выработки сыра. Даны практические рекомендации по применению молокосвертывающих ферментных препаратов.

**Ключевые слова:** сыр, микробный коагулянт, рекомбинантный химозин, специфическая активность, неспецифическая активность, термостабильность

**Для цитирования:** Основные технологические свойства заменителей сычужного фермента / А. В. Гришкова, А. Н. Белов, А. Ю. Просеков, А. В. Миронова // Сыроделие и маслоделие. 2024. № 1. С. 47-52. <https://www.doi.org/10.21603/2073-4018-2024-1-3>

Источник изображения: unsplash.com



## Введение

В производстве сыра молокосвертывающим ферментным препаратом (МФП) отводится одна из ключевых ролей. Главная функция таких препаратов заключается в непосредственном участии в свертывании молока – одной из важнейших технологических операций.

Весь ассортимент молокосвертывающих ферментных препаратов, предлагаемых рынком, может применяться для выработки сыров. Однако технологи сыродельного производства должны учитывать, что у разных коагулянтов есть различия в протеолитической специфике, которые находят свое отражение на качестве получаемой продукции [1]. Как показывает практика, при выработке сыра без учета особенностей молокосвертывающих препаратов предприятия экономят копейки на стоимости ферментов и теряют рубли на качестве продукции, например, используя в производстве сыров с высокой температурой второго нагревания и классических видов с низкой температурой второго нагревания с длительным сроком созревания препараты микробного синтеза [2]. В то же время последние можно рекомендовать для производства быстросозревающих сыров с коротким сроком хранения или мягких сыров без созревания (брынзы, «Осетинского», «Адыгейского» и других видов сыров, в том числе диетических).



Источник изображения: i.mprash.com

В настоящее время в сыродельном производстве широко используют заменители сычужного фермента, поиск которых начался еще во второй половине XX в. Причинами этого поиска являлись рост объемов производства сычужных сыров и возникший в связи с этим острый дефицит сырья. Кроме того, важным фактором является растущий интерес определенных групп населения к вегетарианским, халяльным и кошерным продуктам, требующий исключения использования ферментов животного происхождения [3].

К заменителям сычужного фермента относятся протеазы микробного происхождения и так называемый рекомбинантный химозин.

К микробialным коагулянтам относятся следующие: Fromase производства DSM Food Specialties (Голландия); Microclerici производства Cagliificio Clerici SPA (Италия); Valiren производства Valley Research, inc. USA; Milase производства CSK food enrichment (Голландия) и др. Протеазы микробного происхождения, используемые в сыроделии, разрезают молекулу *κ*-казеина на более мелкие частицы, чем сычужный фермент, что неизбежно приводит к потерям белка [4, 5].

К коагулянтам, продуценты которых получены с использованием рекомбинантной ДНК, относятся: Maxiren (продуцент молочные дрожжи *Kluveromyces lactis*) производства DSM Food Specialties (Голландия); CHY MAX (продуцент *Aspergillus niger* var. *avamori*) производства Chr. Hansen (Дания) и др., хорошо известные сыроделам.

К неоспоримым преимуществам рекомбинантных химозинов следует отнести возможность крупномасштабного производства, что снижает себестоимость продукции. Кроме того, генно-инженерные химозины обладают низкой неспецифической протеолитической активностью, предсказуемым коагулянтным действием [6, 7]. Исследования показали, что рекомбинантный химозин позволяет получать сыры, идентичные по интенсивности и типу протеолиза, консистенции, процессу созревания и качеству сырам, выработанным с применением натурального сычужного фермента. Однако рекомбинантные химозины, при скрупулезном исследовании, не всегда оказываются «100 % чистым», как заявляют производители [8].

Мировой опыт работы с заменителями сычужного фермента показывает, что препараты животного происхождения по стабильности процесса производства сыра и качеству готовой продукции превосходят коагулянты из микробialных источников [8].

Важно отметить, что выбор молокосвертывающего фермента осуществляется с учетом особенностей сырьевой зоны, ассортимента выпускаемой продукции, учета свойств самих препаратов. В связи с этим **цель работы** заключалась в исследовании основных технологических характеристик заменителей сычужного фермента, применяемых на сыродельных предприятиях Алтайского края.

### Объекты и методы исследования

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 микробialный коагулянт **Fromase 2200 TL**, полученный из *Rhizomucor miehei*, компания DSM Food Specialties», Голландия; рекомбинантный химозин **CHY-MAX**, продуцент *Aspergillus niger* var. *avamori*, компания Chr. Hansen, Дания.

Абсолютную молокосвертывающую активность определяли по ОСТ 10288–2001. Протеолитическую активность – по методу Каверзневой [9]. Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «ЧДА» или «ХЧ». Особенности исследования чувствительности к ионам кальция, pH и термостабильности описаны [10].

## Результаты и их обсуждение

### Результаты исследования протеолитической активности спектрофотометрическим методом (рис. 1).

Низкая протеолитическая активность рекомбинантного химозина СНУ-МАХ объясняется высокой степенью очистки, которая в настоящее время достигается производителями. Еще в начале 2000 годов качество данного препарата было недостаточно высоким. Исследования методом высокоэффективного электрофореза в ультратонком слое полиакриламидного геля, проводимые учеными СибНИИС в тот период, показали, что СНУ-МАХ содержал 69 % белка, соответствующего химозину (масса 38 кД), и 31 % других белковых компонентов. В препарате обнаружено четыре минорных полипептидных компонента с молекулярными массами 36,1; 28,7; 27,4 и 13,9 кД, которые могли быть как продуктами посттрансляционной модификации химозина, так и компонентами культуральной среды [2]. Сейчас, как заявляет производитель, в процессе производства препарата методом ферментации используется технология, предусматривающая полную очистку продукта и удаление всех следов нежелательных субстанций и микроорганизма-продуцента, при этом изолируется только один необходимый фермент – химозин. Полученный химозин является 100 % чистым ферментом и обладает ограниченной протеолитической активностью. Чистота определялась с помощью метода FPLC – Fast-flow Protein Liquid Chromatography [11]. Рекомбинантные химозины имеют высокую молокосвертывающую и низкую общую протеолитическую активность и почти не отличаются от натурального телячьего сычужного фермента по такому показателю, как выход сыра [12].

Если в результате активности телячьего химозина в процессе свертывания молока образуются только два продукта – казеинмакропептид и пара-казеин, – то в случае использования коагуля-

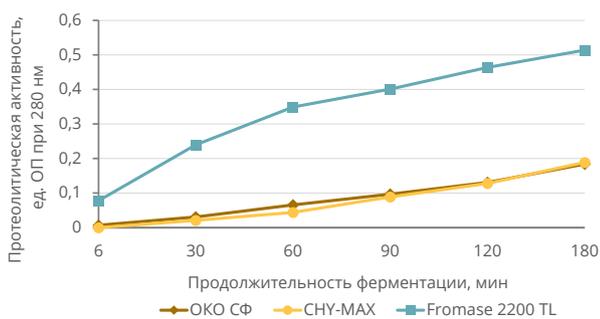


Рисунок 1. Протеолитическая активность заменителей сычужного фермента



Источник изображения: shprash.com

тов из микроскопических грибов, наблюдается сильный неспецифический протеолиз *κ*-казеина и пара-*κ*-казеина и накопление низкомолекулярных продуктов их протеолитической деградации, что отражено в результатах полученных исследований препарата Fromase 2200 TL (рис. 1). Как следствие, в случае использования микробных коагулянтов при выработке сыров наблюдается достоверное снижение выхода продукта по сравнению с коровьим химозином [13, 14].

Кроме этого, неспецифический гидролиз казеинов молока ведет к ухудшению технологических характеристик сыворотки, которая используется для изготовления некоторых продуктов питания (например, некоторые виды напитков, альбуминные пасты и пр.).

**Влияние концентрации хлористого кальция на молокосвертывающую активность.** Для производства большинства видов сыров используется пастеризованное молоко. Процесс пастеризации приводит к снижению растворимости фосфатов кальция и их необратимой преципитации

ции в форме  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Снижение концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке значительно ухудшает его способность к коагуляции, в результате время образования сгустка увеличивается. На практике в пастеризованное молоко вносят  $\text{CaCl}_2$  из расчета 0,1–0,5 г/л, что вызывает частичное снятие отрицательного заряда мицелл. В результате продолжительность свертывания молока сокращается [15].

Важно учитывать, что при повышении концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке увеличивается не только специфическая (молокосвертывающая) активность молокосвертывающих ферментных препаратов (МФП), но и их неспецифическая (протеолитическая) активность, которая может приводить к снижению выхода и потребительских свойств сыра (горький вкус, мажущая консистенция и пр.). Поэтому определение чувствительности МФП к изменению концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке является важным с точки зрения технологии сыроделия.

Графики зависимости времени образования сгустка от концентрации хлористого кальция в молочном субстрате, полученные для коммерческих МФП, представлены на рисунке 2.

Внесение ионов кальция в пастеризованное молоко приводит к уменьшению времени его свертывания под действием исследуемых МФП (рис. 2). Это может свидетельствовать о снижении отрицательного заряда на мицелле казеина, что хорошо согласуется с литературными данными [14]. Наибольшую чувствительность к увеличению концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке на всех этапах исследования показал препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX. Напротив, в диапазоне 4–5 мМ активность препарата Fromase 2200 TL ниже по сравнению с CHY-MAX на 22,9 %, а с ОКО сычужного фер-

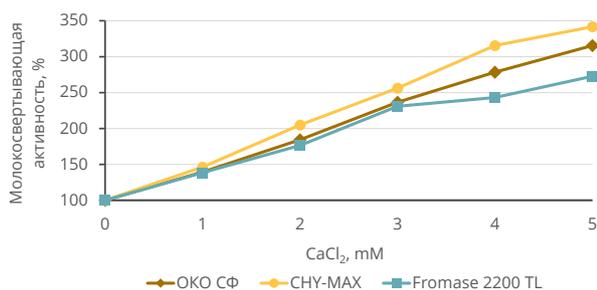


Рисунок 2. Влияние концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке на молокосвертывающую активность ферментных препаратов

мента ~ 10 %. Снижение чувствительности к содержанию  $\text{Ca}^{2+}$  при его высоких концентрациях в молоке (0,4–0,5 г/л) у Fromase 2200 TL является положительным фактором, поскольку дает возможность варьировать количество вносимого хлорида кальция и таким образом нивелировать риск развития ещё большей избыточной ПА, свойственной для коагулянта, полученного путём микробного синтеза.

**Влияние pH молока на молокосвертывающую активность.** Активная кислотность среды – существенный фактор, влияющий на активность молокосвертывающих ферментных препаратов (МФП). Снижение уровня pH положительно влияет не только на активность фермента, но и на физико-химическое состояние казеина, поскольку это приводит к снижению отрицательного заряда казеинов [16]. В то же время, при повышении pH молока, отрицательные поверхностные заряды мицелл казеина растут, вместе с чем возрастают силы межмицеллярного отталкивания. В результате скорость коагуляции молока снижается [17].

Уровень активной кислотности молока при внесении ферментного препарата в сыродельную ванну существенно выходит за пределы pH-оптимума фермента. В связи с этим одним из требований к технологическим молокосвертывающим ферментам является способность эффективно коагулировать молоко при значениях pH, лежащих за пределами pH-оптимума МФП. Влияние концентрации ионов водорода на продолжительность свертывания молока представлено на рисунке 3.

Рассмотренный диапазон pH важен с точки зрения технологии сыродельного производства. При активной кислотности 6,5 ед. pH молокосвертывающие ферменты вносятся в молочную смесь для коагуляции. В этой точке активность CHY-

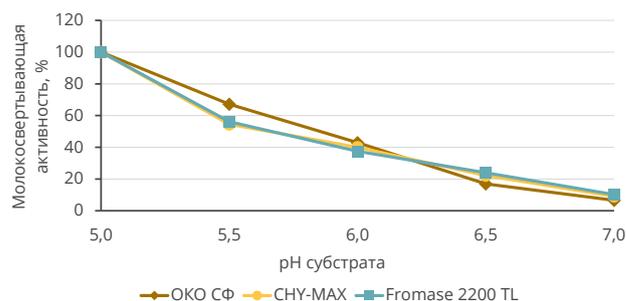


Рисунок 3. Влияние pH молока на молокосвертывающую активность ферментных препаратов

MAX и Fromase 2200 TL была выше, чем у ОКО СФ. В то же время при pH 5,5 (активная кислотность в полутвердых сырах после прессования) активность ОКО СФ выше ~ на 11 % по сравнению с препаратом Fromase 2200 TL и ~ на 12 % – с СНУ-MAX. Известно, что до 6 % (по некоторым данным эта величина выше) молокосвертывающего фермента переходит в сгусток, таким образом, оказывая влияние на процесс созревания сыра. Учитывая высокую неспецифическую активность Fromase 2200 TL, небольшое снижение активности по сравнению с эталонным образцом сычужного фермента, является положительным моментом. Но в любом случае производителям необходимо учитывать все факторы, выбирая коагулянт для выработки сыра.

Термостабильность является одним из регуляторов уровня протеолиза при созревании сыра. Молокосвертывающие ферментные препараты (МФП), остающиеся в сырной массе, влияют на неспецифичный протеолиз, так как для них субстратами становятся  $\alpha$ - и  $\beta$ -казеины [17, 18]. 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 тер-

мостабильности МФП считается температура, при которой фермент сохраняет не менее 80 % от исходной молокосвертывающей активности.

Результаты исследования термостабильности контрольных растворов ферментных препаратов представлены на рисунке 4.

Видно, что термостабильность исследуемых препаратов снижается в ряду: ОКО СФ, Fromase 2200 TL, СНУ-MAX. Динамика снижения молокосвертывающей активности исследуемых МФП различна. Пороговой точкой для ОКО СФ является температура 60 °С, после чего происходит быстрая потеря активности. Термоинактивация Fromase 2200 TL (термолабильная) происходит в две стадии: медленная потеря активности (ниже исходной ~ на 5,6 %) при 45 °С и быстрая, начиная с 50 °С (молокосвертывающая активность ниже ~ на 36,2 %), что являлось порогом термостабильности, при 65 °С наступила полная инактивация фермента. В три этапа происходила потеря активности препарата СНУ-MAX – на 6 % при 40 °С; 13,5 % – при 45 °С; при 50 °С наступила полная инактивация фермента. Важно отметить, что при 30 °С, близкой к температуре свертывания молочной смеси (~ 32 °С), активность препаратов СНУ-MAX и Fromase 2200 TL приближалась к максимальному уровню в отличие от ОКО СФ.



Источник изображения: unsplash.com

## Выводы

Исследования заменителей сычужного фермента показали, что рекомбинантный химозин СНУ-MAX обладает низкой неспецифической активностью, в то же время этот показатель у препарата микробного синтеза Fromase 2200 TL значительно выше, что не позволяет применять его для производства сыров с длительными сроками созревания и хранения. Наибольшую чувствительность к увеличению концентрации ионов кальция  $\text{Ca}^{2+}$  в молоке показал препа-

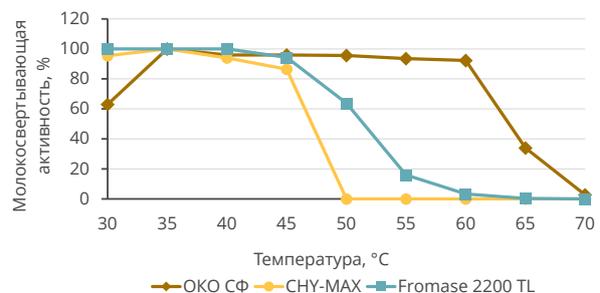


Рисунок 4. Влияние температуры на молокосвертывающую активность ферментных препаратов

рат рекомбинантного химозина СНУ-МАХ, напротив, препарат Fromase 2200 TL менее зависим от этого показателя, что является положительным фактором, поскольку дает возможность варьировать количество вносимого хлорида кальция и таким образом нивелировать риск развития еще большей избыточной ПА, свойственной для коагулянта, полученного путем микробного синтеза. Показатели зависимости продолжительности свертывания молока при различных значениях pH в диапазоне 5,0–7,0 у всех исследу-

емых МФП оказались близки и находились в соответствии с требованиями, предъявляемыми в сыроделии к коагулянтам молока. Порог термостабильности для Fromase 2200 TL – 50 °С, полная инактивация наступала при 65 °С. Термоинактивация для рекомбинантного химозина наступала при 50 °С. Технологические характеристики препарата СНУ-МАХ позволяют его использовать при производстве сыров с длительными сроками созревания и хранения, в том числе с высокой температурой второго нагревания. ■

### The main technological properties of rennet substitutes

Anastasia V. Grishkova<sup>1,2</sup>, Alexander N. Belov<sup>1</sup>, Alexander Yu. Prosekov<sup>3</sup>, Anna V. Mironova<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 depends on the process of obtaining a milk clot under the action of a milk-converting enzyme. Most types of cheeses can be produced using the full range of dairy coagulants available on the market. However, without taking into account their technological features, enterprises save pennies on the cost of enzymes and lose rubles on the quality of products. The main technological characteristics of rennet enzyme substitutes (proteolytic activity, sensitivity to Ca<sup>2+</sup> ions, pH, temperature stability), important for regulating the coagulation process during cheese production, are investigated. Practical recommendations on the use of milk-clotting enzyme preparations are given.

**Key words:** cheese, microbial coagulant, recombinant chymosin, specific activity, nonspecific activity, sensitivity to Ca<sup>2+</sup> 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. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2019-1-24-26>; <https://elibrary.ru/yuiiwt>
- Белов, А. Н. Молокоосвертывающие препараты / А. Н. Белов, В. В. Ельчанинов, А. Д. Коваль // Сыроделие и маслоделие. 2004. № 1. С. 14–16. <https://elibrary.ru/qcblbd>
- Ельчанинов, В. В. Краткая ретроспектива применения и изучения молокоосвертывающих ферментов / В. В. Ельчанинов // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 5. С. 26–28.
- Корох, Д. А. Ферментные препараты Московского завода сычужного фермента. Современное состояние / Д. А. Корох // Молочная промышленность Сибири: Сборник материалов IV специализированного конгресса (Барнаул, 26–27 октября 2004 г.). – Барнаул, 2004. С. 142–144.
- Коваль, А. Д. Свойства молокоосвертывающих препаратов и их влияние на процесс созревания сыра: дис. ...канд. техн. наук. – Кемерово, 2005. – 122 с.
- Repelius, K. Coagulants produced by fermentation technology / K. Repelius // Aust. J. Dairy Technol. 1998. N 53. P. 124.
- Rogelj, I. Recombinant Lamb Chymosin as an Alternative Coagulating Enzyme in Cheese Production / I. Rogelj [et al.] // J. Dairy Sci. 2001. N 84. P. 1020–1026. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74561-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74561-4).
- Кригер, А. В. Молокоосвертывающие ферменты, используемые в сыроделии / А. В. Кригер, А. Н. Белов // Сборник тезисов VIII Специализированного конгресса «Молочная промышленность Сибири». – Барнаул, 2012. – С. 96–101.
- Каверзнева, Е. Д. Стандартный метод определения протеолитической активности для комплексных препаратов протеаз // Прикладная биохимия и микробиология. 1971. Т. VII. Вып. 2. С. 225–228.
- Гришкова, А. В. Технологические свойства препаратов сычужного фермента / А. В. Гришкова, А. Ю. Просеков, А. Д. Коваль // Сыроделие и маслоделие. 2024. № 4. С. 56–60. <https://doi.org/10.21603/2073-4018-2023-4-9>; <https://elibrary.ru/itjfhf>
- Горина, Т. А. Инновации в области молокоосвертывающих ферментов / Т. А. Горина // Сыроделие и маслоделие. 2009. № 3. С. 50–51. <https://elibrary.ru/kzqvwb>
- Беленькая, С. В. Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.) / С. В. Беленькая [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593. <https://doi.org/10.1134/S0555109918060053>; <https://elibrary.ru/tnyghk>
- D'Incecco, P. Impact of Extending Hard-Cheese Ripening: A Multiparameter Characterization of Parmigiano Reggiano Cheese Ripened up to 50 Months / P D'Incecco [et al.] // Foods. 2020. V. 9. P. 268 <https://doi.org/10.3390/foods9030268>
- Mane, A. Proteolysis in Irish farmhouse Camembert cheese during ripening / A. Mane, P. L. H. McSweeney // J. Food Biochem. 2020. V. 44. № 1. P. 13101 <https://doi.org/10.1111/jfbc.13101>
- Майоров, А. А. Проблемы повышения выхода сыра / А. А. Майоров, И. М. Мироненко, А. А. Байбикова // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 2. С. 19–23. <https://elibrary.ru/nhtoct>
- Lucey, J. A. Formation and physical properties of milk protein gels / J. A. Lucey // J. Dairy Sci. 2002. № 85. P. 281–294. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74078-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74078-2)
- Zhao, Z. Effects of pH-modification on the rennet coagulation of concentrated casein micelles suspensions / Z. Zhao, M. Corredig // Food Chemistry. 2020. V. 316. P. 126199 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126199>
- Gaiaschi, A. Proteolysis of  $\alpha$ s-casein as a marker of Grana Padano cheese ripening / A. Gaiaschi [et al.] // J. Dairy Sci. 2000. № 83. P. 2733–2739.
- Gaiaschi, A. Proteolysis of  $\beta$ -casein as a marker of Grana Padano cheese ripening / A. Gaiaschi [et al.] // J. Dairy Sci. 2001. № 84. P. 60–65.