УДК 577.151

ИЗУЧЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОТЕОЛИЗА ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM* СОВМЕСТНО С СЫЧУЖНЫМ ФЕРМЕНТОМ

М.А. Кушевская[1,*], О.В. Шабанова[2], О.В. Кригер[1], Л.А. Остроумов[1], И.А. Смирнова[1], Л.М. Захарова[1]

[1]ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47

[2]ООО Фирма «Калория», 353720, Россия, Краснодарский край, Каневской район, Стародеревянковская, ул. Украинская, 100

**e-mail: stas-asp@mail.ru*

Дата поступления в редакцию: 27.04.2015
Дата принятия в печать: 03.11.2015

Среди процессов, лежащих в основе созревания сыров, основным является процесс протеолиза. Протеолиз в процессе созревания сыра протекает под влиянием специальных ферментных систем – протеиназ, молокосвертывающих ферментов, а также энзимов, синтезируемых различной микрофлорой, присутствующей в сыре. Благодаря протеолитическим реакциям сыры обогащаются аммиачным раствором, снижается плотность сыров и улучшается их консистенция – становится более упругой. В ходе работы изучена каталитическая активность ферментных систем плесневых грибов *Penicillium caseicolum*. Результаты исследований позволили установить, что наибольшей протеолитической активностью обладает кислая протеаза, значение активности которой достигает (1,20±0,07) мкМ(субстрата)/мг(белка)·ч, кислая карбоксипептидаза имеет такую же каталитическую активность, как и щелочная аминопептидаза. Активность данных ферментов в мицелии плесневых грибов *Penicillium caseicolum* составляет (1,17±0,07) мкМ(субстрата)/мг(белка)·ч, в то время как металлопротеаза имеет каталитическую активность (1,14±0,06) мкМ(субстрата)/мг(белка)·ч. Результаты исследований позволили установить, что совместное применение плесневых грибов *Penicillium caseicolum* и сычужного фермента ускоряет протеолитические процессы при созревании мягких сыров. Анализ электрофоретического исследования пептидных профилей сыров свидетельствует о том, что плесневые грибы *Penicillium caseicolum* являются носителями высокоактивной протеолитической системы. Так, по истечении 12 ч гидролиза белковых веществ массовая доля последних снизилась на 9–13 %, а массовая доля свободных аминокислот и пептидов различной молекулярной массы увеличилась. Также установлено, что введение в образец исследования дополнительно сычужного фермента ускоряет протеолитические процессы. Согласно представленным пептидным профилям увеличивается скорость накопления органических азотистых соединений.

Плесневые грибы *P. caseicolum*, сыр, протеолитическая ферментативная система, протеолиз, гидролиз белков, пептиды, свободные аминокислоты, органолептические показатели

Введение

Среди процессов, лежащих в основе созревания сыров, основным является процесс протеолиза. Хорошо известен тот факт, что чем глубже протекает протеолиз, тем выше органолептические показатели сыров. Протеолиз в процессе созревания сыра протекает под влиянием специальных ферментных систем – протеиназ, молокосвертывающих ферментов, а также энзимов, синтезируемых различной микрофлорой, присутствующей в сыре. Благодаря протеолитическим реакциям сыры обогащаются аммиачным раствором, снижается плотность сыров и улучшается их консистенция – становится более упругой.

На первых стадиях созревания сыр имеет горький вкус. Прежде всего это связано с тем, что на начальных стадиях процесса образуется большое количество пептидов, отличных друг от друга молекулярной массой, но при дальнейшем их гидролизе горечь исчезает.

Неприятный вкус сыра образуется за счет присутствия низкомолекулярных пептидов, кроме этого, вкус сыра зависит от вкуса аминокислот, входящих в состав низкомолекулярных пептидов и занимающих терминальное положение в пептидной цепи. Отщепление из полипептидной цепи аминокислоты, обусловливающей неприятный горький вкус с помощью протеиназ, способствует устранению горечи. Тем не менее неуправляемый протеолиз также может привести к появлению неприятного вкуса.

Разнообразные факторы, вызывающие появление горьких полипептидов в сыре, проявляют свое действие либо через изменение физико-химических свойств белковых компонентов сыра, либо через изменение активности ферментных систем (эти параметры зависят от pH, содержания соли и воды в сыре, температуры созревания), что и обусловливает изменение характера и направленности протеолиза в созревающем сыре.

Согласно литературным данным химическими показателями процесса созревания сыра являются методы качественной и количественной оценки протеолиза: экстракция азотсодержащих компо-

нентов сыра и их фракционирование специфическими осадителями с последующим определением азота во фракциях методом Кьельдаля, электрофорез, хроматография [1].

Степень разрушения белковой молекулы следует анализировать по переходу белкового азота в растворимую форму (метод Кьельдаля). Использование данного метода для количественной характеристики процесса протеолиза является общепринятым.

Установлено, что при воздействии ферментной системы плесневых грибов на казеин молока образуется разнообразный набор продуктов реакции. Эта проблема изучена неполно, и до сих пор остается вопрос о том, каким образом оценивать свойства и каталитическую активность плесневых грибов в частности, плесневых грибов рода *P. caseicolum*. Процесс протеолиза сыра протекает не только под действием ферментной системы плесневых грибов, но и еще под влиянием сычужного фермента, применяемого для коагуляции молока. В результате ферментативной реакции казеин молока под влиянием сычужного фермента распадается на олигопептиды с различной молекулярной массой: более 50 % составляют олигопептиды с молекулярной массой менее 16 000 Да и всего 5 % и менее образуются олигопептиды с молекулярной массой менее 3000 Да [1, 2].

У технологов молочной промышленности и сыроделов прижились такие термины, как «глубина» и «ширина» протеолиза. Под «глубиной» протеолиза ученые понимают степень гидролиза белка молока до свободных аминокислот, а под «шириной» – общие масштабы протеолитических процессов [3, 4].

Установлено, что эти процессы существенно влияют на органолептические показатели готовых сыров. В этой связи необходимо проводить качественную и количественную оценку активности протеолитической системы плесневых грибов, используемых в сыроделии. Ассортимент сыров с плесневой микрофлорой, развивающейся как на поверхности, так и внутри сырной головки, связан с действием многих факторов физической, химической, микробиологической и биохимической природы. Большое значение принадлежит виду используемого молока, его физико-химическому составу и свойствам, микробиологическому состоянию, режимам подготовки для переработки на сыр, составу, свойствам и активности используемой заквасочной микрофлоры, способам ее применения, технологическим параметрам получения сырной массы; режимам и продолжительности созревания сыров.

Целью настоящей работы является изучение каталитической активности ферментных систем грибов *Penicillium caseicolum* и оценка интенсивности протеолиза ферментных систем грибов *Penicillium caseicolum* совместно с сычужным ферментом.

Объекты и методология исследования

Объектами исследований на разных этапах работы являлись: коровье молоко высшего и первого сорта по ГОСТ Р 52054, соответствующее требованиям «Технического регламента на молоко и молочную продукцию» № 88-ФЗ от 12.06.08; плесневые грибы рода *P. caseicolum*, соответствующие ТУ 10-02-02-91 «Культуры плесеней для мягких сыров», разрешенные к применению в порядке, установленном законодательством Российской Федерации, обеспечивающие получение сыров, соответствующих классификационным характеристикам и требованиям документов в области стандартизации; молокосвертывающий ферментный препарат по ОСТ 10 288 «Препараты ферментные молокосвертывающие».

При выполнении научно-исследовательской работы применяли стандартные, общепринятые, а также оригинальные методы исследования. Активную кислотность определяли потенциометрическим методом с помощью потенциометрического анализатора по ГОСТ 26781.

Каталитическую активность протеолитической ферментной системы плесневых грибов оценивали по изменению массовой доли нингидринположительных веществ в реакционной смеси. Принцип метода заключается в наблюдении и последующем обсчете изменения содержания нингидринположительных продуктов в реакционной смеси и либо внеклеточного фермента исследуемого микроорганизма, накапливающийся в среде [5, 6].

Активность протеолитического комплекса с помощью метода Бенке.

Результаты и их обсуждения

Качество сыра зависит от направленности и интенсивности ферментативных реакций, в результате которых готовый продукт приобретает характерные органолептические показатели (вкус, аромат, запах). Важную роль при этом играют липолиз и протеолиз, протекающие под действием ферментов, присутствующих в молоке, закваске и плесневых грибах. В табл. 1 представлена каталитическая активность некоторых ферментных систем, локализованных в мицелии плесневых грибов *P. caseicolum.*

Таблица 1

Каталитическая активность ферментных систем плесневых грибов рода *P. caseicolum*

Наименование фермента	Значение активности, мкМ/мг белка · ч
Протеаза	1,20±0,07
Металлопротеаза	1,14±0,06
Карбоксипептидаза	1,17±0,07
Аминопептидаза	1,17±0,07
Липаза кислая	1,06±0,06
Липаза щелочная	1,43±0,08

Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о том, что плесневые грибы рода *P. caseicolum* содержат высокоактивную протеолитическую и липолитическую ферментные системы.

Наибольшей каталитической активностью обладает кислая протеаза, кислая карбоксипептидаза имеет такую же каталитическую активность, как и щелочная аминопептидаза.

В технологии производства сыра с плесневыми грибами *P. caseicolum* для развития плесневых грибов, коагуляции молока и получения сырного зерна используется сычужный фермент. Сычужный фермент способствует протеканию неспецифичного протеолиза, что способствует образованию необходимой консистенции и вкуса готового сыра. Кроме этого, сычужный фермент путем гидролиза as_1- и β-казеинов катализирует реакцию отщепления гликомакропептида от к-казеина на участке $Фал_{105}$ – $Мет_{106}$ при сквашивании сырого молока при созревании сыра, подготавливает субстрат для действия протеолитических ферментов плесневых грибов *P. caseicolum* [6].

С целью более глубокого изучения протеолитических реакций, протекающих в процессе созревания сыров с плесневыми грибами *P. caseicolum*, проводили исследования, направленные на определение качественного и количественного состава пептидного профиля сыра.

Технологический процесс производства сыра с использованием плесневых грибов *Penicillium caseicolum* начинается с приемки основного и вспомогательного сырья с последующей оценкой его качества. После нормализации молоко пастеризуется при температуре (75±2) °С с выдержкой 20–25 с, охлаждается до температуры (32±2) °С, затем добавляется водный раствор хлористого кальция, бактериальная закваска, состоящая из молочнокислых стрептококков, и молокосвертывающий фермент. Время свертывания составляет 25–35 мин. При этом готовый сгусток должен при расколе иметь острые края, выделять прозрачную сыворотку и иметь нормальную консистенцию по плотности. Далее осуществляется обработка сгустка и сырного зерна.

Полученная масса подвергается второму нагреванию при температуре (38±2) °С в течение (15±5) мин, формуется наливом и направляется на самопрессование в течение 5–10 мин. Затем сырная масса направляется на чеддеризацию, плавление раствором соли 8–12 % при температуре (72±2) °С с последующим обсушиванием сыра при температуре (10±2) °С, относительной влажности реакционной среды 80 % в течение 8–10 ч, после чего на сыр наносится раствор чистых культур плесени путем окунания головок сыра в раствор или путем равномерного разбрызгивания его на поверхность сыра.

Результаты исследований пептидных профилей, полученных в присутствии плесневых грибов *P. caseicolum* с применением и без применения сычужного фермента, приведены на рис. 1 и 2.

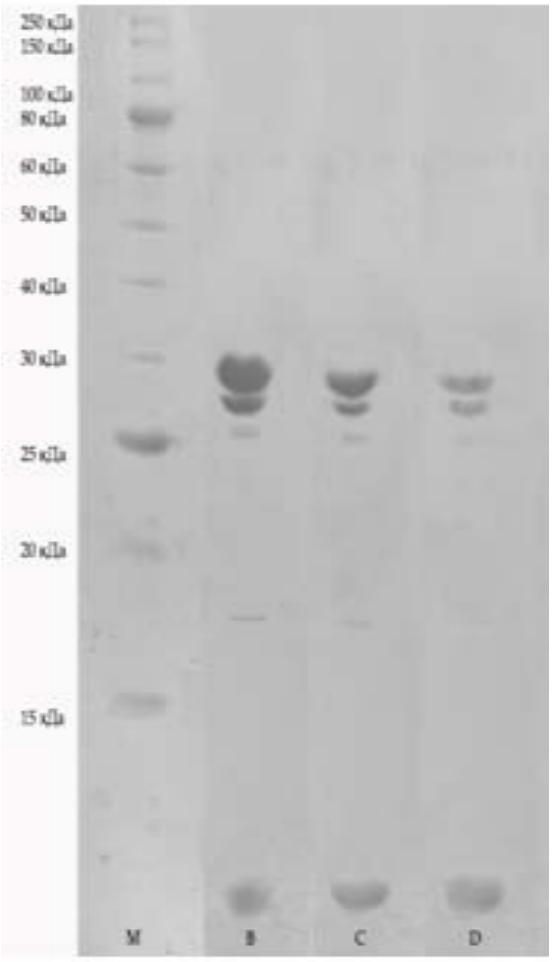

Рис. 1. Результаты электрофоретических исследований сыров с добавлением плесневых грибов рода *P. caseicolum*

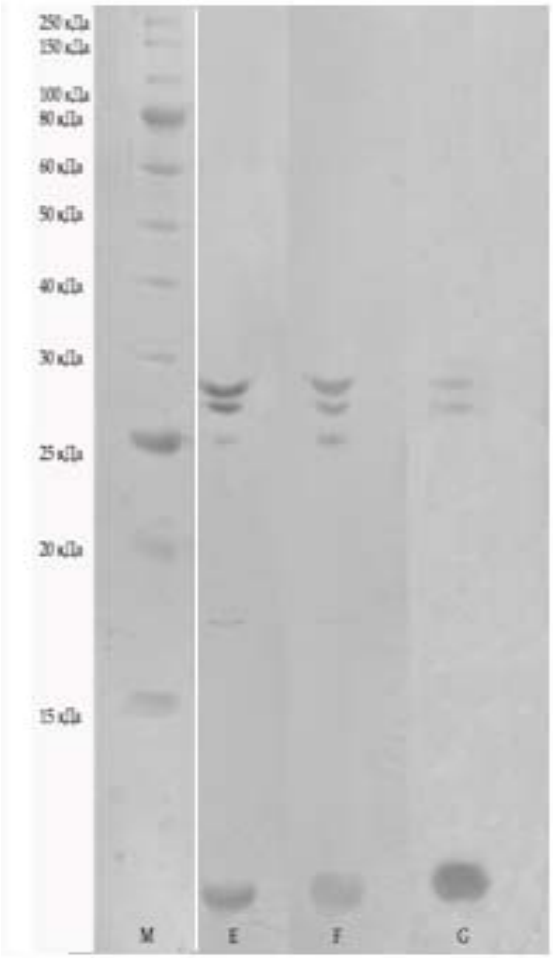

Рис. 2. Результаты электрофоретических исследований сыров с добавлением плесневых грибов рода *P. caseicolum* и сычужного фермента:

Анализ результатов исследований, представленный на рис. 1, свидетельствует о том, что ферментная протеолитическая система плесневых грибов обладает высокой каталитической активностью. Так, например, через 12 ч протеолиза в присутствии плесневых грибов рода *P. caseicolum* массовая доля белка в исследуемом образце снизилась на 9–13 %, отмечается интенсивное накопление продуктов распада белков – массовая доля олигопептидов и полипептидов, а также свободных аминокислот увеличивается. Также установлено, что введение в образец исследования дополнительно сычужного фермента ускоряет протеолитические процессы. Согласно представленным пептидным профилям увеличивается скорость накопления органических азотистых соединений (табл. 2).

Таблица 2

Активность протеолитической ферментной системы плесневых грибов рода *P. caseicolum*

Продолжительность гидролиза, ч	Массовая доля общего азота, %					
	молоко с плесневыми грибами			молоко с плесневыми грибами и сычужным ферментом		
	белки	пептиды	свободные аминокислоты	белки	пептиды	свободные аминокислоты
	B	C	D	E	F	G
4,00±0,05	0,47±0,028	0,01±0,001	0,005±0,001	0,45±0,027	0,02±0,001	0,01±0,001
8,00±0,05	0,45±0,027	0,02±0,001	0,01±0,001	0,44±0,026	0,03±0,002	0,01±0,001
12,00±0,05	0,43±0,023	0,03±0,002	0,02±0,001	0,42±0,025	0,04±0,001	0,02±0,001

Таким образом, в ходе исследований провели анализ активности протеолитической ферментной системы плесневых грибов рода *P. caseicolum* . Полученные результаты не противоречат литературным данным и позволяют обосновать оптимальные технологические параметры производства сыров, созревающих с использованием плесневых грибов *P. caseicolum*.

Список литературы

1. Градова, И.Б. Лабораторный практикум по общей микробиологии. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 130 с.
2. Гусев, М.В. Микробиология. – М.: Академия, 2003. – 150 с.
3. Давидович, Е.А. Сравнительная оценка селективных микологических агаровых сред для выделения и подсчета ксерофильных плесневых грибов и осмотолерантных дрожжей, присутствующих в белом сахаре-песке / Е.А. Давидович // Пищевая и перерабатывающая промышленность. Реферативный журнал. – 2005. – № 4. – С. 1304.
4. Диланян, З.Х. Влияние дрожжей *Torulopsis 304* на процесс созревания советского сыра / З.Х .Диланян, Г.Г. Блок, А.С. Сагоян // Сборник докладов межвузовской конференции по молочному делу. – Ереван, 1971. – С. 163–166.
5. Просеков, А.Ю. Современные аспекты производства продуктов питания: монография / А.Ю. Просеков. – Кемерово: КемТИПП, 2005. – 381 с.
6. Садовая, Т.Н. Биотехнология сыров с плесневыми грибами *Penicillium*: монография. – Кемерово: Кузбассвузиздат, 2011. – 212 с.

STUDY ON PROTEOLYSIS INTENSITY OF ENZYME SYSTEMS FORMED BY FUNGI OF GENUS OF *PENICILLIUM* AND RENNET

M.A. Kushevskaya[1,*], O.V. Shabanova[2], O.V. Kriger[1], L.A. Ostroumov[1], I.A. Smirnova[1], L.M. Zakharova[1]

[1]Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia

[2]LLC "Firm "Kaloriya", 100, Ukrainian Str., Staroderevyankovskaya, Krasnodar region, 353720, Russia

**e-mail: stas-asp@mail.ru*

Received: 27.04.2015
Accepted: 03.11.2015

Proteolysis is the main process among those occurring during cheese ripening. In cheese ripening process proteolysis takes place under the influence of specific enzymatic systems known as proteinases, milk-curdling enzymes and those synthesized by various microflora which is presented in cheese. Due to proteolytic reactions cheeses are enriched with an ammonia solution, the density of cheeses being reduced and their consistency being improved by becoming firmer. The catalytic activity of the enzyme systems of mold fungi *Penicillium caseicolum* has been studied. The research results revealed that acidic protease has the highest proteolytic activity, its value reaching 1.20 ± 0.07 uM (substrate) / mg (protein) · ch. Acidic carboxypeptidase has the same catalytic activity as the alkaline aminopeptidase. The activity of these enzymes in the mycelium of mold fungi *Penicillium caseicolum* is 1.17 ± 0.07 uM (substrate) / mg (protein) · ch, while metalloprotease has catalytic activity 1.14 ± 0.06 uM (substrate) / mg (protein) · ch. The research results revealed that the combined use of mold fungi *Penicillium caseicolum* and rennet accelerates proteolytic processes when

ripening of soft cheeses occurs. Electrophoretic analysis of cheese peptide profiles study demonstrates that mold fungi *Penicillium caseicolum* are the carriers of the proteolytic system of high activity. Thus, after 12 hours of protein substance hydrolysis their mass fraction lowed by 9-13%, and the mass fraction of free amino acids and peptides of different molecular weight increased. It has been established that the additional introduction of rennet into the sample accelerates the proteolytic processes. According to the presented peptide profiles the rate of accumulation of organic nitrogenous compounds increases.

Mold fungi of the genus of *P. caseicolum*, cheese, proteolytic enzyme system, proteolysis, hydrolysis of proteins, peptides, free amino acids, organoleptic characteristics

References

1. Gradova I.B. *Laboratornyy praktikum po obshchey mikrobiologii* [Laboratory workshop on general microbiology]. Moscow, DeLi print Publ., 2001. 130 p.

2. Gusev M.V. *Mikrobiologiya* [Microbiology]. Moscow, Akademiya Publ., 2003. 150 p.

3. Davidovich E.A. Sravnitel'naya otsenka selektivnykh mikologicheskikh agarovykh sred dlya vydeleniya i podscheta kserofil'nykh plesnevykh gribov i osmotolerantnykh drozhzhey, prisutstvuyushchikh v belom sakhare-peske [Comparative assessment of selective mycologic agar environments for allocation and calculation the kserofilnykh of mold mushrooms and the osmotolerantnykh of the yeast which are present at white granulated sugar]. *Pishchevaya i pererabatyvayushchaya promyshlennost'. Referativnyy zhurnal* [Food and processing industry. refereed journal], 2005, no. 4, pp. 1304.

4. Dilanyan Z.Kh., Blok G.G., Sagoyan A.S. Vliyanie drozhzhey Torulopsis 304 na protsess sozrevaniya sovetskogo syra [Influence of yeast Torulopsis 304 of the Soviet of cheese the maturation process]. *Sbornik dokladov mezhvuzovskoy konferentsii po molochnomu delu* [Collection of reports of interuniversity conference on dairy case]. Erevan, 1971, pp. 163–166.

5. Prosekov A.Yu. *Sovremennye aspekty proizvodstva produktov pitaniya* [Modern aspects of food production]. Kemerovo, KemIFST Publ., 2005. 381 p.

6. Sadovaya T.N. *Biotekhnologiya syrov s plesnevymi gribami Penicillium* [Biotechnology cheese with mold fungi *Penicillium*]. Kemerovo, Kuzbassvuzizdat Publ., 2011. 212 p.

Дополнительная информация / Additional Information

Изучение интенсивности протеолиза ферментных систем грибов рода *Penicillium* совместно с сычужным ферментом / М.А. Кушевская, О.В. Шабанова, О.В. Кригер, Л.А. Остроумов, И.А. Смирнова, Л.М. Захарова // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – Т. 39. – № 4. – С. 30–34.

Kushevskaya M.A., Shabanova O.V., Kriger O.V., Ostroumov L.A., Smirnova I.A., Zakharova L.M. Study on proteolysis intensity of enzyme systems formed by fungi of genus of *Penicillium* and rennet. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2015, vol. 39, no. 4, pp. 30–34. (In Russ.)

Кушевская Марина Александровна
аспирант кафедры бионанотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056,Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, тел.: +7 (3842) 39-68-74, e-mail: stas-asp@mail.ru

Шабанова Ольга Владимировна
технолог, ООО Фирма «Калория», 353720, Россия, Краснодарский край, Каневской район, Стародеревянковская, ул. Украинская, 100

Кригер Ольга Владимировна
канд. техн. наук, доцент, професcсор кафедры бионанотехнологии, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, тел.: +7 (3842) 39-68-74, e-mail: olgakriger58@mail.ru

Остроумов Лев Александрович
д-р техн. наук, профессор, профессор-консультант Научно-образовательного центра, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет)», 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47

Смирнова Ирина Анатольевна
д-р техн. наук, профессор, заведующий кафедрой технологии молока и молочных продуктов, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности» (университет), 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, тел.: +7 (3842) 39-68-58, email: milk@kemtipp.ru

Захарова Людмила Михайловна
д-р техн. наук, профессор, профессор кафедры технологии молока и молочных продуктов, ФГБОУ ВО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности» (университет), 650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47, тел.: +7 (3842) 39-68-58

Marina A. Kushevskaya
Postgraduate Student of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-74, e-mail: stas-asp@mail.ru

Olga V. Shabanova
Technologist, LLC “Firm “Kaloriya”, 100, Ukrainian Str., Staroderevyankovskaya, Krasnodar region, 353720, Russia

Olga V. Kriger
Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor of the Department of Bionanotechnology, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-74, e-mail: olgakriger58@mail.ru

Lev A. Ostroumov
Dr.Sci.(Tech.), Professor, Professor and Consultant of the Center of Research and Education, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia

Irina A. Smirnova
Dr.Sci.(Tech.), Professor, Head of the Department of Milk and Dairy Products Technology, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-58, email: milk@kemtipp.ru

Lyudmila M. Zakharova
Dr.Sci.(Tech.), Professor, Professor of the Department of Milk and Dairy Products Technology, Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), 47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-58