



Научная статья
4.3.3 – Пищевые системы (технические науки)
УДК 637.144.5

doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2024.04.017



ТЕМПЕРАТУРНЫЙ ОПТИМУМ КОММЕРЧЕСКИХ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ

Анастасия Викторовна Гришкова ¹, Юлия Геннадьевна Стурова ²
Александр Николаевич Белов ³, Анатолий Дмитриевич Коваль ⁴

^{1,2} Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова, Барнаул, Россия

¹ Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул, Россия

^{1, 3, 4} ФГБНУ ФАНЦА, отдел СибНИИС, лаборатория биохимии молока и молочных продуктов, Барнаул, Россия

¹ anastasiya-kriger@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1117-0489>

² y_sturova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4492-6628>

³ beloffan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4045-2493>

⁴ anatokoval@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7832-7159>

Аннотация. Молокосвёртывающим ферментным препаратам отводится важная роль в производстве сыра. Первая важная функция МФП – это непосредственное участие в одной из важнейших технологических операций – свёртывании молока. Продолжительность свёртывания и структурно-механические свойства сырного сгустка – критические важные показатели, от которых зависят содержание влаги в сыре, активная кислотность сыра, динамика проникновения соли в сырную массу, выход сыра, структура, консистенция, рисунок и другие показатели, характеризующие качество сыра. Необходимо принимать во внимание, что производитель устанавливает молокосвёртывающую активность (МА) и рассчитывает дозировку фермента с использованием стандартизованного молочного субстрата. На индивидуальном сыродельном предприятии характеристики молочной смеси могут варьировать и не совпадать с его показателями. В результате расход вносимого МФП может отличаться от значений, рекомендуемых производителем коагулянта молока. Внесение завышенной дозы молокосвёртывающего фермента может негативно повлиять на выход и качество производимого сыра из-за избыточного протеолиза. В связи с этим оценка молокосвёртывающей активности имеет большое значение. Температурный оптимум – одна из общих биохимических характеристик МФ, которая позволяет оценить МА препарата на основных технологических этапах выработки сыра.

Ключевые слова: молокосвёртывающие ферменты, производство сыра, коагуляция молочной смеси, молокосвёртывающая активность, температурный оптимум.

Благодарности: 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., Стурова Ю. Г., Белов А. Н., Коваль А. Д. Температурный оптимум коммерческих молокосвертывающих ферментов // Ползуновский вестник. 2024. № 4. С. 111–115. doi: 10.25712/ASTU.2072-8921.2024.04.017, EDN: <https://elibrary.ru/NCIZOI>.

Original article

TEMPERATURE OPTIMUM OF COMMERCIAL MILK-CONVERTING ENZYMES

Anastasia V. Grishkova ¹, Yulia G. Sturova ², Alexander N. Belov ³,
Anatoly D. Koval ⁴

^{1,2} Polzunov Altai State Technical University, Barnaul, Russia

¹ Altai State Medical University, Barnaul, Russia

^{1,3,4} FGBNU FANTSA, SibNIIS Department, Laboratory of Biochemistry of milk and dairy products, Barnaul, Russia

¹ anastasiya-kriger@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1117-0489>

© Гришкова А. В., Стурова Ю. Г., Белов А. Н., Коваль А. Д., 2024

² y_sturova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4492-6628>

³ beloffan@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4045-2493>

⁴ anatokoval@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7832-7159>

Abstract. Milk-converting enzyme preparations play an important role in cheese production. The first important function of the MFP is direct participation in one of the most important technological operations - milk coagulation. The duration of coagulation and the structural and mechanical properties of the cheese clot are critically important indicators on which the moisture content in cheese, the active acidity of cheese, the dynamics of salt penetration into the cheese mass, cheese yield, structure, consistency, pattern and other indicators characterizing the quality of cheese depend. It should be taken into account that the manufacturer sets the milk-clotting activity (MA) and calculates the dosage of the enzyme using a standardized milk substrate. At an individual cheese-making enterprise, the characteristics of the milk mixture may vary and not coincide with its indicators. As a result, the consumption of the introduced MFP may differ from the values recommended by the manufacturer of the milk coagulant. The introduction of an excessive dose of a milk-converting enzyme can negatively affect the yield and quality of the cheese produced due to excessive proteolysis. In this regard, the assessment of milk-clotting activity is of great importance. The temperature optimum is one of their common biochemical characteristics of MF, which allows us to evaluate the MA of the drug at the main technological stages of cheese production.

Keywords: milk-converting enzymes, cheese production, coagulation of milk mixture, milk-converting activity, temperature optimum.

Acknowledgements: The work was performed 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 FZMM-2024-0003, reg. R&D No. 124013000666-5).

Forcitation: Grishkova, A.V., Sturova, Yu.G., Belov, A.N. & Koval, A.D. (2024). Temperature optimum of commercial milk-converting enzymes. *Polzunovskiy vestnik*. (4), 111-115. (In Russ). doi: 10/25712/ASTU.2072-8921.2024.04.017. EDN: <https://elibrary.ru/NCIZOI>.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на российском рынке представлен значительный выбор МФП отечественных и зарубежных производителей. Современный рынок, несмотря на влияние, оказываемое санкционной политикой стран Евросоюза, представляет для выбора большой перечень продукции. Большинство видов сыров могут быть выработаны с использованием всего спектра молочных коагулянтов, представленных на рынке, однако различия в протеолитической специфике у разных коагулянтов приведут к получению некоторых различий в консистенции и вкусе сыров [1, 2, 3, 4]. Поэтому при выработке сыра для получения продукта высокого качества необходимо учитывать особенности биохимических свойств молокосвёртывающих препаратов [5, 6, 7].

В производстве сыра молокосвёртывающим ферментным препаратам отводится одна из ключевых ролей. Первая важная функция МФП – это непосредственное участие в одной из важнейших технологических операций – свёртывании молока. Продолжительность свёртывания и структурно-механические свойства сырного сгустка – критически важные показатели, от которых зависят содержание влаги в сыре, активная кислотность сыра, динамика проникновения соли в сырную массу, выход сыра, структура, консистенция, рисунок и другие показатели,

характеризующие качество сыра. В связи с этим оценка молокосвёртывающей активности (МА) имеет большое значение. На этикетке МФП всегда указан показатель МА, но необходимо принимать во внимание, что производитель устанавливает его и рассчитывает дозировку фермента с использованием стандартизованного молочного субстрата. На индивидуальном сыродельном предприятии характеристики молочной смеси могут варьировать и не совпадать с его показателями. В результате расход вносимого МФП может отличаться от значений, рекомендуемых производителем коагулянта молока. Внесение завышенной дозы молокосвёртывающего фермента может негативно повлиять на выход и качество производимого сыра из-за избыточного протеолиза [8, 9, 10].

Температурный оптимум (Т-оптимум) – одна из общих биохимических характеристик МФ, которая позволяет оценить молокосвёртывающую активность на основных технологических этапах выработки сыра, связанных с изменением температуры от момента свёртывания молока до стадий прессования и посолки [10, 11].

Целью данной работы является исследование температурного оптимума молокосвёртывающих ферментных препаратов различного происхождения отечественных и зарубежных производителей, применяемых на сыродельных предприятиях края.

МЕТОДЫ

Исследования проводились в лаборатории биохимических исследований ФГБНУ ФАНЦА, отдел СибНИИ сыроделия.

В качестве эталонного образца сравнения применяли Отраслевой контрольный образец сычужного фермента (ОКО СФ). Исследованы натуральные МФП: сычужный фермент (СФ), сычужно-говяжий (ВНИИМС СГ-50) и говяжий пепсин (ГП) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента», Россия; сычужные препараты Calfrennet Clerici 96/4 и Calfrennet Clerici 70/30, сычужно-говяжий препарат Clerici 50/50 – «Caglificio Clerici SPA», Италия; микробиальный коагулянт Fromase 2200 TL, полученный из *Rhizomucormiehei*, – «DSM Food Specialties», Голландия; препараты рекомбинантного химозина: CHY-MAX, производитель *Aspergillusnigervar. Avamori*, – «Chr. Hansen», Дания и Maxiren 1800, производитель *Kluyveromycesmarxianusv. lactis*, – «DSM Food Specialties».

Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «чда» или «хч».

Оценку МА проводили согласно ОСТ 10288-2001 «Препараты ферментные молоко-свёртывающие».

Подготовка молоко-свёртывающих ферментных препаратов (МФП). Готовили 1%-ные растворы исследуемых МФП в дистиллированной воде. Перед исследованием рас-

творы ферментов прогревали при 35 °С в течение 15 минут на водяной бане и охлаждали до комнатной температуры.

Температурный оптимум молоко-свёртывающей активности:

Подготовка молока. В молоко коровье пастеризованное с м.д.жира 3,2 % вносили натрия азид (NaN₃) до конечной концентрации 0,02 %, доводили рН до 6,5 и вносили 3 mM CaCl₂. Субстрат прогревали в течение 10 мин на водяной бане в диапазоне температур от 30 °С до 60 °С с интервалом 5 °С.

Для определения Т-оптимума, МА исследуемых ферментов выражали в %. За 100 % принимается максимальное значение МА. Порогом Т-оптимума считали температуру, при которой исследуемый МФ сохранял не менее 80 % от максимальной МА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Исследование показало, что молоко-свёртывающая активность (МА) ферментных препаратов находилась в пределах от 103 тыс. до 293 тыс. у.е./г. При этом в ряде случаев фактическая МА не совпадала с декларируемой. В таблице 1 представлены данные по абсолютным значениям МА исследованных МФП при температуре 35 °С. В таблице 2 приведены результаты исследований по определению МА МФП в зависимости от температуры субстрата.

Таблица 1 – Молоко-свёртывающая активность ферментных препаратов при температуре 35 °С
Table 1 – Milk-clotting activity of enzyme preparation sat a temperature of 35 °С

Наименование препарата	Фактическая МА, у.е./г	Декларируемая МА, у.е./г
Отраслевой контрольный образец сычужного фермента ОКО СФ	114 290	
Сычужный фермент СФ	151 160±1251	150000±5000
Сычужно-говяжий ВНИИМС СГ-50	110000±1261	100000±5000
Говяжий пепсин ГП	175 195±2876	150000±5000
Calf rennet Clerici 96/4	281387±1057	300000
Calf rennet Clerici 70/30	114 010±1003	100000
Сычужно-говяжий Clerici 50/50	103 322±1173	100000
Fromase 2200 TL полученный из <i>Rhizomucormiehei</i>	293568±1865	275000
CHY-MAXпроизводитель <i>Aspergillusnigervar. avamori</i>	238853±3254	260000
Maxiren 1800 производитель <i>Kluyveromycesmarxianus v. lactis</i>	223463±1759	225000

Таблица 2 – Влияние температуры субстрата на МА МФП

Table 2 – Effect of substrate temperature on MAMFP

Исследуемый МФП	МА (%) при температуре, °С						
	30	35	40	45	50	55	60
ОКО СФ	38,6 ± 1,5	62,2 ± 1,8	74,1 ± 0,9	86,4 ± 3,2	92,1 ± 0,5	100	100
Сычужный фермент СФ	38,2 ± 2,1	57,3 ± 0,1	71,6 ± 1,7	85,9 ± 2,4	93,2 ± 3,6	100	80,9 ± 1,6
ВНИИМС СГ-50	31,4 ± 0,1	53,3 ± 2,7	64,0 ± 1,2	72,7 ± 1,7	84,2 ± 0,8	100	69,6 ± 1,5
Говяжий пепсин ГП	33,0 ± 1,2	51,4 ± 2,6	64,3 ± 2,3	78,3 ± 2,4	90,2 ± 1,1	100	80 ± 2,5
Calf rennet Clerici 96/4	32,3 ± 1,8	45,0 ± 0,9	57,1 ± 3,3	71,4 ± 1,4	86,9 ± 2,8	100	100
Calf rennet Clerici 70/30	35,5 ± 1,6	48,2 ± 1,4	62,1 ± 2,3	79,4 ± 2,8	89,1 ± 4,5	100	96,4 ± 1,5
Clerici 50/50	43,2 ± 2,8	57,4 ± 3,1	67,3 ± 1,8	83,1 ± 4,3	91,5 ± 2,7	100	77,1 ± 2,7
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
Fromase 2200 TL	21,1 ± 1,8	32,2 ± 2,7	46,2 ± 2,1	66,7 ± 3,2	85,7 ± 4,7	100	85,7 ± 2,8

Из графиков зависимости МА коммерческих образцов натуральных МФП отечественного производства от температуры субстрата видно, что в диапазоне температур от 30 °С до 55 °С МА ферментов плавно нарастает, а при температуре субстрата 60 °С – быстро снижается, достигая порога Т-оптимума, за исключением эталонного образца ОКО СФ, МА которого в интервале от 55 °С до 60 °С выходит на плато (рис. 1).

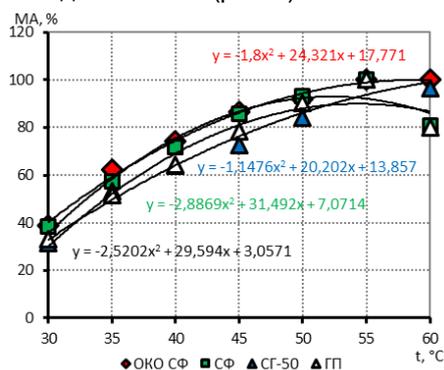


Рисунок 1 – Зависимость МА коммерческих образцов натуральных МФП отечественного производства от температуры молочного субстрата

Figure 1 – Dependence of the MA of commercial samples of natural MFPs domestic production depends on the temperature of the milk substrate

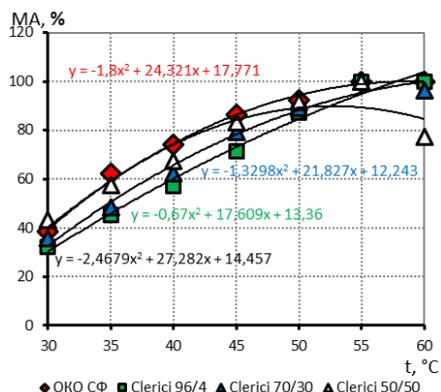


Рисунок 2 – Зависимость МА коммерческих образцов натуральных МФП зарубежного производства от температуры молочного субстрата

Figure 2 – Dependence of MA of commercial samples of natural MFPs of foreign production from the temperature of the milk substrate

Из рисунка 2 видно, что коммерческие образцы МФП животного происхождения производства «Cagificio Clerici SPA» (Италия) по мере увеличения температуры в диапазоне от 35 °С до 60 °С ранжируются следующим образом: Clerici 96/4 < Clerici 70/30 < Clerici 50/50. Чем выше доля пепсина в составе ферментного препарата, тем более высокая активность наблюдалась при повышении температуры. При достижении Т-оптимума препарат Clerici 96/4 МА выходит на плато в интервале от 55 °С до 60 °С, так же, как ОКО СФ. Эти препараты сопоставимы по доле

химозина в составе, которая, согласно нашим исследованиям, равна 91,5 % для ОКО СФ и 93,7 % для Clerici 96/4. Напротив, для препаратов Clerici 70/30 и Clerici 50/50 в интервале 55–60 °С наблюдали снижение МА. При этом препарат Clerici 50/50 оказался за порогом Т-оптимума, т.к. сохранил < 80 % (~77,1%) от максимальной МА.

Таким образом, для МФП животного происхождения наблюдалась закономерность: при температуре, лежащей за пределами оптимума, ферментные препараты, содержащие высокую долю пепсина в своём составе, теряют значительную часть своей специфической, а, следовательно, и протеолитической активности (ПА). Это является положительным фактором, учитывая, что высокую общую ПА следует рассматривать как негативное технологическое свойство. Учитывая низкую ПА препарата Clerici 96/4, сохранение им высокой активности при 60 °С не является негативным моментом. Учитывая, что при хорошей растворимости данного молокосвёртывающего фермента в сырное зерно переходит не более 6 % препарата [4], то его участие в процессе созревания сыра будет играть положительную роль, поскольку продукты умеренного гидролиза казеина будут являться субстратом для протеиназно-пептидазной системы заквасочной микрофлоры.

У препаратов рекомбинантного химозина CHY-MAX и Maxigen 1800 в диапазоне температур от 30 до 45 °С наблюдалась одинаковая молокосвёртывающая активность (рисунок 3).

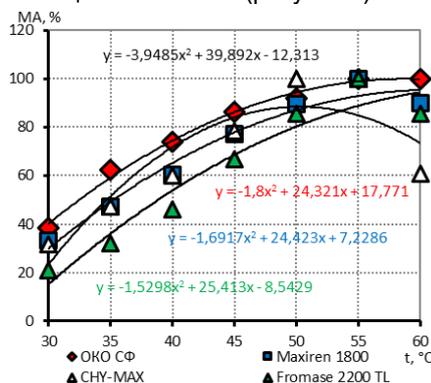


Рисунок 3 – Зависимость МА коммерческих образцов микробного коагулянта и препаратов рекомбинантного химозина от температуры молочного субстрата

Figure 3 – Dependence of MA of commercial samples of microbial coagulant and recombinant chimesin preparations on the temperature of the milk substrate

Но Т-оптимум CHY-MAX наступал при достижении 50 °С, и максимальная активность сохранялась в интервале 50–55 °С. При температуре 60 °С МФ оказался за порогом Т-оптимума, т.к. сохранял < 80 % (~60,7%) от максимальной МА. Т-оптимум для Maxigen 1800 наступил при достижении 55 °С, при температуре 60 °С МФ потерял только 10 % активности, что коррелирует с более высокой термостабильностью этого варианта химозина. В слу-

чае микробимального коагулянта Fromase 2200 TL наблюдали более низкую специфическую активность по сравнению с препаратами рекомбинантного химозина в диапазоне температур от 30 °С до 55 °С, что является положительным моментом, учитывая высокую абсолютную протеолитическую активность препарата. Т-оптимум для этого фермента наступил при достижении 55 °С, при 60 °С МФП потерял ~ 14,3 % от максимальной МА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённые исследования показали, что МФ животного происхождения, содержащие высокую долю пепсина в своём составе, имеют меньший Т-оптимум по сравнению с препаратами сычужного фермента. Микробимальный коагулянт Fromase 2200 TL имел более низкую специфическую активность по сравнению с препаратами рекомбинантного химозина. Учитывая высокую общую протеолитическую активность указанных МФП, это является положительным фактором. Высокие значения Т-оптимума МФП следует рассматривать как негативное технологическое свойство, поскольку при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания фермент будет проявлять высокую общую протеолитическую активность. Прежде всего, данное утверждение следует отнести к сырам Швейцарской группы, при выработке которых максимальная температура нагревания сырного зерна может достигать 58 °С.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перспективы применения комплексных МФП для производства созревающих сычужных сыров / Д.В. Абрамов, Д.С. Мягконосов, И.Н. Делицкая, В.А. Мордвинова, Т.Э. Муничева, Е.Г. Овчинникова // Сыроделие и маслоделие. 2019. № 1. С. 24–26.
2. Influence of differend milk-clotting enzymes on the process of prodacing semi hard cheeses / D.S. Myagkonosov, I.T. Smykov, D.V. Abramov, I.N. Delitskaya, E.G. Ovchinnikova // Food Systems. 2023. Т. 6. № 6. Р. 103–116. DOI: 10.21323/2618-9771-2023-6-1-103-116.
3. Rennets and Coagulants / P.L.H. McSweeney, J.P. McNamara // Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition), Academic Press. 2022. Р. 316–320. DOI: 10.1016/B978-0-12-818766-1.00268-3.
4. Скрининг и Исследование продуцентов молоко-свертывающих ферментов среди культур высших базидиальных грибов / Д.В. Минаков, Я.В. Уразова, А.А. Минакова // Ползуновский вестник. 2022. № 3. С. 173–180. DOI: 10.25712/ASTU.2072-8921.2022.03.024.
5. 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 (*Bostaurus taurus*, L). Сыроделие и маслоделие. 2017. № 6. С. 40–43.

6. Беленькая С.В., Рудометов А.П., Щербаков Д.Н., Балабова Д.В., Кригер А.В., Белов А.Н., Коваль А.Д., Ельчанинов В.В. Некоторые биохимические свойства рекомбинантного химозина альпака (*Vicugna pacos* L.) // Прикладная биохимия и микробиология. 2018. Т. 54. № 6. С. 585–593.

7. Effect of ripening time on proteolysis, free amino acids, bioactive amines and texture profile of Gorgonzola-type cheese / M.M.M. Gisela, R.G.B. Costa, V.A.M. Teodoro, J.C.J. Paula, D. Sobral, C. Fernandes, M. Beatriz A. Gloria // LWT. 2018. Vol. 98. P. 583–590. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.09.026.

8. Мурунова Г.В., Свириденко Ю.Я. Принципы подбора молоко-свертывающего фермента для производства сыра // Сыроделие и маслоделие. 2006. № 5. С. 2–4.

9. Ardö Y. Enzymes in Cheese Ripening // Food Engineering Series. Springer, Cham. 2021. 363–395. DOI: 10.1007/978-3-030-55482-8_15.

10. Влияние физико-химических факторов на специфическую активность протеаз, применяемых в биотехнологии сыров / Ю.Г. Стурова, А.В. Гришкова, В.В. Коньшин, А.Ю. Просеков // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2024. Т. 14, № 3(50). С. 352–361. DOI: 10.21285/achb.935.

11. Формирование органолептических показателей сыров и управление процессом созревания / А.Н. Белов, А.В. Кригер, А.Д. Коваль, В.А. Миклишанский // Сыроделие и маслоделие. 2018. № 4. С. 10–12.

Информация об авторах

А. В. Гришкова – к.т.н., доцент, ст. науч. сотр. АлтГТУ, ФГБНУ ФАНЦА, отдел СибНИИС, АлтГМУ.

Ю. Г. Стурова – к.т.н., доцент, ст. науч. сотр. АлтГТУ.

А. Н. Белов – кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии молока и молочных продуктов, ФГБНУ ФАНЦА, отдел СибНИИС.

А. Д. Коваль – кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии молока и молочных продуктов, ФГБНУ ФАНЦА, отдел СибНИИС.

Information about the authors

A.V. Grishkova - Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor, Senior Researcher, Polzunov Altai State Technical University, FGBNUFANTSA, SibNIIS Department, Altai State Medical University.

Yu.G. Sturova - Cand. Sci. (Engineering), Associate Professor, Senior Researcher, Polzunov Altai State Technical University.

A.N. Belov - Candidate of Technical Sciences, leading researcher at the Laboratory of Biochemistry of Milk and Dairy Products, FGBNUFANTSA, SibNIIS Department.

A.D. Koval - Candidate of Technical Sciences, Leading Researcher at the Laboratory of Biochemistry of Milk and Dairy Products, FGBNUFANTSA, SibNIIS Department.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare that there is no conflict of interest.

Статья поступила в редакцию 12 марта 2024; одобрена после рецензирования 20 ноября 2024; принята к публикации 04 декабря 2024.

The article was received by the editorial board on 12 Mar 2024; approved after editing on 20 Nov 2024; accepted for publication on 04 Dec 2024.