

# Ферменты для коагуляции молока в сыроделии

С.С.Колесникова,  
Канд.техн.наук, ИПДО НУПТ

Существует большое количество протеолитических ферментов животного, растительного или микробного происхождения, обладающих способностью коагулировать казеиновый комплекс. Наиболее известным ферментом для коагуляции молока, механизм действия которого в достаточной степени установлен, является сычужный фермент, представляющий собой смесь химозина и пепсина. Согласно IDF Standard 110 молокосвертывающая активность сычужного (телячьего) фермента и говяжьего пепсина и их смесей при pH 6,5, в телячьем сычуге содержится более 98 % химозина и менее 2 % говяжьего пепсина, в говяьем пепсине содержится менее 2 % химозина и более 98 % говяжьего пепсина(1).

Реннин (сычужный фермент) находится в соке четвертого отдела желудка телят, гидролизует пептиды и по своей специфичности близок к пепсину, хотя по сравнению с последним, обладает более узкой специфичностью. Так, пепсин инактивирует фермент рибонуклеазу, последовательность аминокислот в которой известна. Реннин не инактивирует рибонуклеазу. Как и пепсин, реннин образуется из зимогена (прореннина) в результате (предположительно) автокаталитической активации. Белок молока казеин состоит из многих компонентов, из которых лишь один, так называемый  $\chi$ - казеин, гидролизует реннином. Гидролизу подвергаются одновременно многие пептидные связи, и  $\chi$  - казеин расщепляется как в растворимой, так и в нерастворимой фракции. В качестве продукта гидролиза идентифицирован гликопротеид с содержанием углеводов до 28%. Нерастворимая фракция, образующаяся при гидролизе  $\chi$ - казеина реннином, была названа пара- $\chi$ -казеином. Неглубокий гидролиз  $\chi$ - казеина реннином приводит к утрате его защитного коллоидного действия в эмульсии молока, следствием чего является осаждение других компонентов казеина ионами  $Ca^{2+}$  (1).

Механизм сычужного свертывания молока сычужным ферментом неоднократно определены в две фазы:

Первичная ферментативная фаза характеризуется тем, что сычужный фермент расщепляет стабилизирующий компонент казеиновой мицеллы -  $\chi$ -казеин; этот процесс сопровождается выделением пептида (казеиномакропептид);

Вторичная фаза коагуляции соответствует образованию геля и агрегированию измененных под действием фермента мицелл.

Первая - ферментативная фаза соответствует избирательному расщеплению в  $\chi$ - казеине одной пептидной связи: Phe<sub>105</sub> – Met<sub>106</sub>, отличающейся своей исключительной неустойчивостью, объясняющейся

природой вовлеченных в этот процесс аминокислот, присутствием смежной сериновой группы и присутствием гидрофобных остатков (лейцин и изолейцин) с каждой из сторон расщепляемой связи. В результате цепь  $\chi$ -казеина оказывается разорванной на два неравных участка: 1-105 это пара- $\chi$ -казеин, а участок 106-169-казеиномакропептид.

Все формы  $\chi$ -казеина независимо от того, содержат они или нет углеводы, претерпевают это гидролитическое расщепление, происходящее с довольно большой скоростью.

Пара- $\chi$ -казеин, связанный с  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеинами, остается в составе мицеллы; он имеет выраженный основной и гидрофобный характер. Казеиномакропептид, включающий в себя возможность присутствовать углеводам, высвобождается и переходит в сыворотку. Он имеет кислый и гидрофильный характер.

Таким образом, состав, структура и соответственно свойства молекулы пара- $\chi$ -казеина резко отличаются от тех же показателей исходного  $\chi$ -казеина, в частности, эта молекула не обладает стабилизирующими свойствами.

Вторичная фаза – фаза коагуляции, которую можно легко наблюдать в молоке, подвергнутом при соответствующей температуре воздействию сычужного фермента, продолжает оставаться

Влияние изменения кислотности на продолжительность коагуляции в известной степени объясняется его воздействием на активность фермента (оптимум рН для воздействия фермента на  $\chi$ -казеин составляет 5,5, а максимальная стабильность его действия находится в интервале рН 5 – 6). Повышение кислотности также положительно сказывается на протекании вторичной реакции вследствие снижения устойчивости казеиновых мицелл, связанного с нейтрализацией зарядов, и вследствие выделения ионов кальция из растворенных и коллоидных комплексов. Наблюдалось, что фаза коагуляции обладает более высокой чувствительностью к снижению рН, чем фаза ферментативной реакции. При изменении рН от 6,7 до 5,6 продолжительность коагуляции сокращается в семь раз, а скорость вторичной реакции возрастает в тридцать раз (2). Этот эффект мы наблюдаем при использовании биологической обработки молока (5-8).

Повышение скорости коагуляции путем снижения рН сопровождается значительным повышением скорости уплотнения геля и уровня его максимальной плотности, за исключением случаев, когда рН составляет менее 6, то есть ниже уровня, при котором начинают ощущаться последствия деминерализации и дезагрегирования казеиновых мицелл (1,2,9-10).

Рассматривая сгусток, полученный с помощью молокосвертывающих ферментов, в состоянии покоя по истечении более или менее продолжительного времени, определяемого условиями его образования,

можно заметить, что на всей поверхности внезапно выступают капли молочной сыворотки. Капли постепенно увеличиваются в размерах, соединяются между собой и, наконец, образуют вокруг сгустка жидкую оболочку, а он тем временем уменьшается в объеме. Этот процесс концентрации сгустка путем выделения воды и растворимых элементов называется синерезисом. Он часто встречается в гельных системах. Для получения сыра (не имеется в виду его созревание) молочная сыворотка, выделяющаяся в процессе синерезиса, независимо от того, находится она вне сгустка или между слоями или зернами, должна быть обязательно отделена от него. Выделяющаяся сыворотка удаляется из сыродельной ванны декантацией или фильтрацией. Общий термин "выделение сыворотки из сгустка" должен подразумевать всю совокупность процессов и операций по отделению сыворотки, а не только синерезис, с которым его часто путают.

На практике сыворотка выделяется в два этапа. На первом происходит собственно выделение, или основное выделение, в ходе которого происходит удаление большей части молочной сыворотки. Этот этап начинается сразу после завершения свертывания, разрезки сгустка и продолжается до момента извлечения сырной массы из форм. Второй этап заключается в дополнительном выделении сыворотки в рассоле и после посолки. Основные элементы этапа: посолка, затем обсушивание сыра. Обсушивание не следует путать с испарением влаги, которая может происходить одновременно с ним.

Таким образом, синерезис сгустков, полученных с использованием молокосвертывающих ферментов, может рассматриваться как результат непрерывного взаимодействия между белками, происходящего в условиях установления связей различных типов, возможность для которого появляется после снижения содержания гидратационной воды, окружающей мицеллы казеина. Постепенное увеличение силы и числа связей ведет к стягиванию волокнистой казеиновой сетки и выделению содержащейся в ее промежутках сыворотки. Кроме этого, представляется возможным, что протеолитическое расщепление, которое происходит в результате действия молокосвертывающего фермента, освобождает реакционноспособные участки, благоприятствующие установлению новых связей, поскольку способность сгустка к выделению сыворотки зависит от интенсивности и специфических особенностей протеолитической активности используемого фермента. Несмотря на действие сил сжатия, выделение сыворотки происходит медленно и в незначительных количествах, так как она с трудом проникает через массу сгустка, которая в силу минерализации отличается низким уровнем проницаемости. Для ускорения процесса выделения сыворотки следует увеличить площадь ее экссудации с помощью разрезки сгустка, чем мельче частички сгустка, тем быстрее выделяется сыворотка, помимо всего прочего на поверхности

разрезанных кусочков сгустка действуют силы, относящиеся к разряду тех, которые управляют поверхностным натяжением жидкости. В этом случае нужно учитывать, что для каждого вида сыра присуща разная величина сырного зерна, для брынзы – слои сырного сгустка или крупное зерно, для сыров твердых - мелкое зерно.

Так как ферменты представляют собой каталитически активные белки, как и все белки, они состоят из аминокислот, кондинсируясь между собой по принципу пептида – через пептидную связь. Для производства ферментов используют такое сырье, как слизистые оболочки сычугов крупного рогатого скота, свиных желудков, сычуги ягнят и козлят или телят молочников, желудки железистые цыплят, цыплят бройлеров и кур. Это сырье животного происхождения. Сычужный фермент – реннин в молоке, как уже выше указывалось, расщепляет казеин на уровне  $\chi$ - казеина и используется для сыров с высокой температурой второго нагревания, типа швейцарского, с длительным сроком созревания полгода и больше. Пепсины принимают участие в дальнейшем расщеплении казеина в процессе созревания сыра, что ускоряет процесс созревания сыров. Поэтому в производстве твердых сыров используются ферменты только животного происхождения.

Микробные ферменты (протеазы), синтезирующие протеиназы, локализующиеся в клетках (эндоферменты), или экстрагируются в культуральную среду (экзоферменты). Различают протеиназы бактерий, плесеней грибов и дрожжей, а в середине этих трех групп – кислые, нейтральные и щелочные протеиназы. Протеиназы плесневых грибов с давних пор используются в пищевой промышленности при приготовлении продуктов питания и приправ, соевых соусов и др., но для производства твердых сыров не используются, только в технологии отдельных мягких сыров. При увеличении объемов производства твердых сыров увеличивается спрос на ферменты животного происхождения. Поэтому производители молокосвертывающих ферментов имеют возможность увеличить их производство, что экономически выгодно, несмотря на сложность заготовки эндокринного сырья,

Было применено множество мер чтобы найти заменители сычужного фермента. Коагуляцию молока может обеспечить множество протеаз, способными обеспечить гидролитическое расщепление  $\chi$ -казеина. Но выполнение этих условий недостаточно для их широкого промышленного внедрения. Заменители сычужного фермента должны обладать целым рядом физико-химических и технологических свойств, соответствовать требованиям, предъявляемым сыроделием, и с условиями, которые обеспечивают высокие пищевые характеристики готового продукта. Необходимо, в

частности, чтобы протеолитическая активность фермента была не очень высокой, поскольку в противном случае, может происходить расщепление чрезмерного количества пептидных связей и значительное количество растворимых белков, которые, в свою очередь, приведут к образованию слабого сгустка. Как результат, потеря сухих веществ в сыворотку в большом количестве, а процесс выделения сыворотки из сгустка замедляется. Кроме того, появляются пороки вкуса и консистенции сыра в процессе созревания.

Заменители сычужного фермента или как называют ферменты микробного происхождения за рубежом – коммерческие, применяют лишь для производства отдельных видов сыров (рассольных, с подплавлением сырной массы или для сырья в производстве плавленых сыров).

В соответствии с большими трудностями классификации микробных протеиназ, их классификация основана на источнике, из которого выделен фермент, и на оптимуме pH.

Различают протеиназы бактерий, плесневых грибов и дрожжей и внутри этих трех основных групп – кислые, нейтральные и щелочные протеиназы.

Протеиназы плесневых грибов с давних пор использовались в пищевой промышленности при изготовлении продуктов питания и приправ. В странах Ближнего и Среднего Востока они используются для приготовления соевого соуса, в других странах – для изготовления определенных сортов сыра. Правда, при этом применяют не ферментные препараты, а живые микроорганизмы, которые используются в качестве продуцентов ферментов.

Некоторые протеиназы плесневых грибов довольно хорошо охарактеризованы, в частности аспергиллопептидаза А из *Aspergillus saitoi*. Это фермент гидролизует пептидные связи и преимущественно те из них, в образовании которых участвуют карбоксильные группы аргинина, лейцина или глутаминовой кислоты.

Фермент аспергиллопептидаза А имеет широкую субстратную специфичность, способен даже активировать трипсиноген до трипсина и химотрисиногена до химотрипсина. Окисленные А - и В - цепи инсулина также эффективно гидролизуются аспергиллопептидазой А.

Грибные протеиназы такого типа (была описана и охарактеризована и аспергиллопептидаза В из *Aspergillus oryzae*) имеют большое значение для технологии пищевых веществ, чем бактериальные протеиназы. Эти протеиназы используются для целенаправленного изменения белков в тесте и делают мягким мясо (1).

Коммерческие ферменты микробного происхождения вырабатываются из плесени *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*.

УкрНИИмясомолпромом (ТИММ) и ВНИИМСом проводились неоднократно технологические испытания практически всех известных на

мировом рынке микробных коагулянтов (Мейто и Милкозим- Япония; Фромаза – Франция; Суперен – США; Максирен (из дрожжей) и др.) и полученные результаты показали неудовлетворительные технологические моменты, что касается качества сыра. И ни на один из ферментов микробного происхождения не была утверждена нормативно-техническая документация, в основном по причине снижения качества выработанных опытных сыров. А в настоящее время без технологического контроля используется все, что предлагается коммерческими структурами (потому, что дешево), ссылаясь на разрешение Минздрава. Но Минздрав проверяет токсичные элементы, микробиологические показатели (колиформы, клостридии, патогенные микроорганизмы, микотоксины, антибиотики, гормональные препараты, пестициды и радионуклиды), но не технологические моменты и не удивительно, что качество твердых сыров на рынке низкое. Если используют Фромазу и Мейто, то не только снижается вкус и консистенция сыра, но и на поверхности сыра растет черная плесень, а ферменты из дрожжей дает вспучивание сыра, и "экопродуктом" такие сыры называться не могут. Поэтому, производитель обязан на этикетке указывать какой фермент использован для выработки сыра и цена сыра должна быть соответствующей, с ферментами животного происхождения сыр должен быть дороже, а с ферментами микробного происхождения дешевле и не надо вводить в заблуждение потребителя. О влиянии таких сыров на здоровье потребителей никто не изучал, а то, что большая часть этих ферментов переходит в сыворотку известно. А она используется на продукты питания и на корм скоту. Некоторые авторы (по специальности далеко не сыроделы), по неизвестным причинам, дают положительные рекомендации коммерческим ферментам микробного происхождения, что специалистов сыроделов очень удивляет (11). Удивляют и производители твердых сыров, правда, технологи на многих предприятиях, в настоящее время, или не решают такие вопросы или не понимают значения и роли молокосвертывающих ферментов животного происхождения в улучшении качества сыра. Однако, сыры, даже на выставках, не отличается высоким качеством.

Хочется процитировать специалиста в области прикладной биотехнологии: " О преимуществах натуральных ферментных препаратов над микробными и трансгенными говорилось немало. Хочется верить, что в конце концов здравый смысл возобладает, и сыроделы вернуться к проверенным годами, успешной работы с натуральными ферментными препаратами " (12). От автора, который неоднократно принимал участие или самолично проводил исследования вышеизложенной проблемы, настоятельно рекомендую использовать молокосвертывающие ферменты и их смеси животного происхождения.

## Использованная литература

1. Прикладная биохимия. Э.-Э.Брухман. Перевод с немецкого канд.биол. наук Р.А.Звягильской./предисловие.чл.-корр.АН СССР проф. В.Л.Кретовича –Москва: "Легкая и пищевая промышленность".1981
2. Производство и качество сыра: технология и качество. Перевод с французского Б.Ф.Богомолова под редакцией и с предисловием Г.Г.Шилера.Москва. ВО"Агропромиздат". 1989.496 стр.
3. IDF STANDARD 157 A: 1997- Bovin Rennits Determination of total milk-clotting activity.
4. IDF STANDARD 110 B: 1997 –Calf Rennet and adult bovine rennet – Determination of chymosin and bovin Pepsin contents.
5. Колесникова С.С. Спосіб виробництва твердого сиру з низькою температурою другого нагрівання. Патент України на винахід №27144, Б.№ 1 від 28.02.2000 (Заявка № 95104480 від 12.10.1995р.).
6. Колесникова С.С. Спосіб виробництва твердого сиру, що самопресується. Патент України на винахід № 27145, Б.№1 від 28.02.2000 (Заявка №95104481 від 12.10.1995 р.).
7. Колесникова С.С. Спосіб одержання гранульованого сиру. Патент України на винахід №29509. Бюл.№6 від 15.11.2000р.
8. Колесникова С.С. Спосіб виробництва твердого сиру з високою температурою другого нагрівання. Патент України на винахід № 3921 від 27.12.94. Бюл.№6-1. Заявка №4946007 від 17.06.91. Припинено дію від 17.06.98 за неуплату ТІММом мита, про що опубліковано 12.09.2000 в Бюл. №4.
9. Колесникова С.С. Рациональная обработка сычужного сгустка. // Технология и оборудование для производства новых молочных продуктов.-Киев.1984. (Сб. науч. тр. /УкрНИИНТИ).
10. Колесникова С.С. Способ производства сычужного сыра голландской группы. Авт. свид. №1303118. БИ № 14, 1987г.
11. До питання вибору молокозсідальних препаратів при виробництві сирів. Сливка Н.Б., Михайлицька О.Р., Андрійчук П.Е.Ж-л " Молочное дело". – Киев. № 5. 2006. Стр.40-41
12. Правильный выбор молокосвертывающих ферментных препаратов – гарантия качества выпускаемых сыров. Федотова А.В.Московский государственный университет прикладной биотехнологии. Ж-л "Молочное Дело." - Киев.№6. 2006. Стр.39.