

Влияние стабилизирующего раствора на специфическую активность и термостабильность препаратов сычужного фермента

Александр Юрьевич Просеков¹, д-р техн. наук, д-р биол. наук, главный научный сотрудник
Анастасия Викторовна Гришкова^{2,3}, канд. техн. наук, старший научный сотрудник, доцент
E-mail: anastasiya-kriger@yandex.ru

Александр Николаевич Белов², канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник

¹Кемеровский государственный университет, Кемерово

²Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, отдел Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул

³Алтайский государственный медицинский университет, Барнаул

Оптимальная продолжительность коагуляции молока при выработке сыра – один из основных факторов, влияющих на его качество и формирование зерна при выработке продукта. Применение растворов с заданным уровнем pH для приготовления молокосвертывающих ферментных препаратов перед коагуляцией молока должно обеспечить более полный переход химозина и пепсина в раствор, активизировать действие ферментных препаратов, снять проблему некачественной воды при приготовлении раствора ферментов. Показано, что использование стабилизирующего раствора способствует повышению молокосвертывающей активности ферментных препаратов и стабилизации их работы в диапазоне температур, применяемых при коагуляции молочной смеси при выработке сыра. Достижение снижения количества вносимого фермента, необходимого для процесса свертывания смеси при выработке сыра, существенно скажется на экономике производства.

Ключевые слова: молокосвертывающие ферменты, специфическая (молокосвертывающая) активность, стабилизирующий раствор, термостабильность

При оценке пригодности молокосвертывающих ферментных препаратов (МФП) для производства сыра в первую очередь оценивается специфическая или молокосвертывающая активность, поскольку оптимальная продолжительность коагуляции молока при выработке сыра – один из основных факторов, влияющих на его качество и формирование зерна при выработке продукта.

Химозин, количество которого в составе сычужного фермента не менее 70 %, является одним из наиболее эффективных молокосвертывающих ферментов, гидролизующих ключевую пептидную связь Phe (105)-Met (106) в молекуле *κ*-казеина.

Однако физико-химические условия в желудке теленка-молокопойника, при которых химозин выполняет свою природную функцию, и в сыродельной ванне, где происходит свертывание специально подготовленной молочной смеси (предварительное внесение стартерной закваски и хлористого кальция), не идентичны [1]. Известно, что уровень активной кислотности

среды, при котором проявляется наибольшая активность химозина, близок к 5,0 ед. pH. Пепсин (в составе СФ не более 30 %) наиболее стабилен в диапазоне pH от 3,0 до 4,5, а активная кислотность молочной смеси перед внесением препарата 6,4–6,5 ед. pH [2]. Именно поэтому одним из требований к технологическим молокосвертывающим ферментам является способность эффективно коагулировать молоко при значениях pH, лежащих за пределами pH-оптима фермента. Важно отметить, что в зависимости от времени года изменяются технологические свойства молока, главным из которых является пониженная или повышенная способность его к свертыванию под действием МФП. Так, например, зимнее молоко часто имеет недостаточную зрелость и низкую кислотность.

Кроме того, важное значение имеет активная кислотность раствора самого молокосвертывающего препарата, которая в большой степени зависит от того, чем растворяют сухие МФП при приготовлении рабочего раствора фермента

перед его внесением в молочную смесь. Производители молокосвертывающих ферментов в инструкции рекомендуют применение дистиллированной воды. Но на предприятиях для приготовления раствора МФП часто используется пастеризованная водопроводная вода, активная кислотность которой может изменяться от 7,0 до 8,0 ед. рН и даже выше в весенний период. При высоких значениях рН происходит инактивация ферментных препаратов, особенно их пепсиновой составляющей. В результате снижается активность фермента в целом, что является одной из основных причин задержки образования сгустка и снижения качества продукции.

Наиболее перспективным, на наш взгляд, является применение растворов с заданным уровнем рН, оптимальным для активации ферментов для растворения МФП перед коагуляцией молока при выработке сыра. Это должно обеспечить более полный переход химозина и пепсина в раствор, активизировать действие ферментных препаратов, снять проблему некачественной воды при приготовлении раствора ферментов.

Интересно было рассмотреть влияние стабилизирующего раствора на термостабильность изучаемых ферментных препаратов в диапазонах температур, значимых для технологии производства сыра. Термостабильность является одним из регуляторов интенсивности и направленности протеолитических реакций при созревании сыра [3].

Целью данной работы являлось исследование влияния стабилизирующего раствора на специфическую (молокосвертывающую) активность и термостабильность препаратов сычужного фермента, широко применяемых длительный период времени на сыродельных предприятиях Алтайского края. Исследования проводились в лаборатории биохимии молока и молочных продуктов отдела СибНИИ сыроделия Федерального Алтайского научного центра агробιοтехнологий.

В качестве эталонного образца сравнения применяли Отраслевой контрольный образец сычужного фермента (ОКО СФ) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента». Исследованы сычужный фермент (СФ) производства ОАО «Московский завод сычужного фермента», Россия; сычужный препарат Calf rennet Clerici 70/30 (Clerici 70/30) – «Caglifacio Clerici SPA», Италия.

Готовили 1 % растворы сухих МФП в дистиллированной воде (контроль) и стабилизирующем растворе (опыт). При определении молокосвертывающей активности дополнительно проводили исследование ферментных препаратов, растворенных в пастеризованной водопроводной воде.

Абсолютную молокосвертывающую активность определяли по ОСТ 10288-2001. Термостабильность МФП определяли путем контроля изменения их молокосвертывающей активности после прогревания в течение 30 мин при заданной температуре. Готовые 1 % растворы сухих МФП прогревали в течение 30 минут на водяной бане, в диапазоне температур от 30 °С до 70 °С с интервалом 10 °С, быстро охлаждали до комнатной температуры и немедленно определяли молокосвертывающую активность.

При определении термостабильности порогом термоинактивации считали температуру прогревания (°С), при которой исследуемый МФП терял $\geq 20\%$ от исходной молокосвертывающей активности.

Все использованные в работе реактивы имели квалификацию «ЧДА» или «ХЧ».

Результаты исследования молокосвертывающей активности растворов ферментных препаратов представлены на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, при растворении МФП в дистиллированной и водопроводной воде молокосвертывающая активность препаратов ОКО СФ и СФ оставалась приблизительно на одном уровне. В то же время, при растворении препарата Calf rennet Clerici 70/30 в водопроводной воде, наблюдали критичное снижение коагулирующей способности, вплоть до практически полной инактивации фермента.

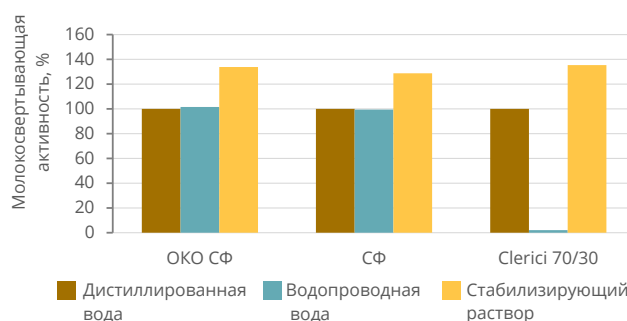


Рисунок 1. Изменение молокосвертывающей активности растворов препаратов сычужного фермента

Следует отметить, что исследования проводились в весенний период и активная кислотность водопроводной воды выходила за пределы 7,0–8,0 ед. рН и составляла 8,49 единиц. Известно, что при изменении рН раствора от 6,5 ед. рН и выше происходит относительно быстрая потеря активности химозина, доля которого является высокой в рассматриваемом ферментном препарате и составляла в наших исследованиях 72,4 %. Активная кислотность рабочего раствора Clerici 70/30 составляла 7,74 ед. рН (рис. 2). Это объясняет рассматриваемые показатели. Препарат широко используется на территории нашей страны, поэтому данная информация крайне важна с точки зрения аспектов его практического применения.

Не исключено, что наблюдаемое нами снижение молокосвертывающей активности в растворах ферментных препаратов вызвано продуктами взаимодействия хлора с органическими соединениями, содержащимися в водопроводной воде.

Применение стабилизирующего раствора также показало положительную динамику, отражающуюся в увеличении коагулирующей способности исследуемых препаратов сычужного фермента. При растворении ферментных препаратов в ацетатном буферном (стабилизирующем) растворе, специфическая активность исследуемых препаратов значительно возросла: на 33 % для ОКО СФ, 29 % для СФ и 35 % для Clerici 70/30 (рис. 1). Уровень активной кислотности растворов в данном случае являлся оптимальным для активации ферментов и находился в диапазоне 4,88–4,98 ед. рН (рис. 2).

Таким образом, применение стабилизирующего раствора для подготовки сухих МФП при выработке сыра позволит снизить дозу фермента, вносимую в сыродельную ванну и, следовательно,

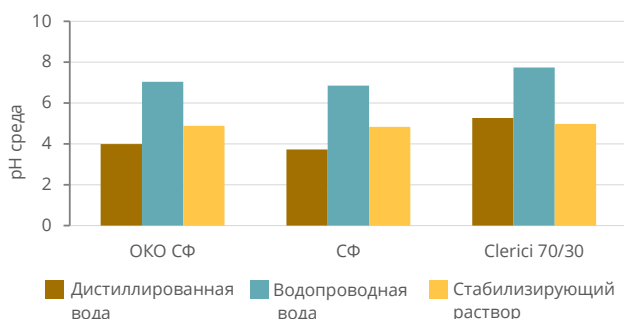


Рисунок 2. Изменение рН растворов препаратов сычужного фермента

расходы предприятия на его приобретение. Для малотоннажного предприятия (производство 1 тысяч тонн сыра в год) экономия денежных средств может составить около полумиллиона рублей в год при стоимости сычужного препарата Calf rennet Clerici 70/30 25000 руб/кг.

Результаты исследования термостабильности опытных растворов коагулянтов, приготовленных в ацетатном буфере, представлены на рисунке 3. Из рисунка видно, что пороговой точкой для всех исследуемых ферментных препаратов является температура 50 °С, до достижения которой специфическая активность всех коагулянтов сохранялась на максимальном уровне, начиная с 30 °С. Это является положительным фактором для оптимизации процесса свертывания смеси. У МФП, растворенных в дистиллированной воде, наблюдались колебания активности в интервале температур от 30 до 40 °С, активность ферментов была ниже оптимального уровня при 30 °С для препарата СФ на 11 %, для Clerici 70/30 на 32,9 % (рис. 4).

Известно, что температуру свертывания молока устанавливают в пределах 28–35 °С в зависимости от вида вырабатываемого сыра, времени

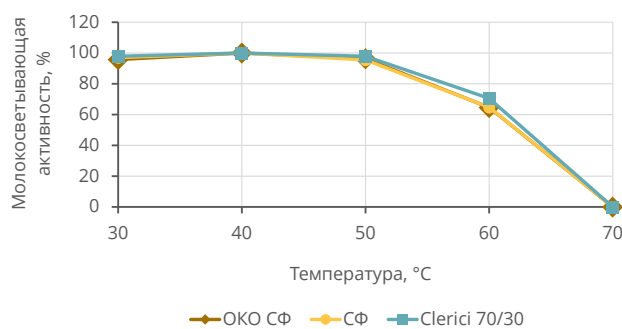


Рисунок 3. Термостабильность препаратов сычужного фермента, приготовленных в стабилизирующем растворе

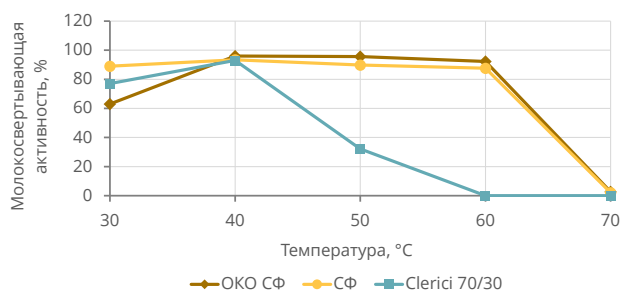


Рисунок 4. Термостабильность препаратов сычужного фермента, приготовленных в дистиллированной воде

года и технологических свойств молока. При пониженной способности молока к свертыванию температуру повышают в допустимых для каждого вида сыра пределах. Повышение температуры способствует ускорению агрегирования белковых частиц, увеличению прочности сгустка, ускорению обсушки сырного зерна до начала второго нагревания. В то же время, излишнее увеличение температуры свертывания приводит к чрезмерному ускорению уплотнения сгустка. Вынужденное дальнейшее ускорение обработки зерна способствует увеличению потерь, нарушению нормального течения молочнокислого процесса. Применение стабилизирующего раствора позволит нивелировать вышеизложенные негативные факторы.

Интересно отметить, что термостабильность контрольного образца сычужного фермента ОКО СФ и опытного образца СФ при использовании стабилизирующего раствора смещается в меньшую сторону. Если при приготовлении рабочего раствора ферментных препаратов в дистиллированной воде при 60 °С опытный образец СФ сохранял высокую активность, то в случае применения буферного раствора эта температура была порогом термоинактивации (наблюдалось

снижение молокосвёртывающей активности > 30 %). Высокий порог термоинактивации – скорее отрицательный фактор, т. к. МФП, сохранивший способность гидролизовать α - и β -казеины, может стать причиной развития пороков вкуса при созревании и длительном хранении сыров [3], поэтому в данной ситуации предлагаемое решение играет положительную роль.

Таким образом, использование стабилизирующего раствора способствует повышению молокосвёртывающей активности ферментных препаратов и стабилизации их работы в диапазоне температур, применяемых при коагуляции молочной смеси при выработке сыра. При этом, можно достичь снижения количества вносимого фермента при выработке сыра, необходимого для процесса свертывания смеси, что существенно скажется на экономике производства.

Лабораторией биохимических исследований Сибирского НИИ сыроделия разработан и утвержден комплект нормативно-технической документации (ТУ 9291-049-00419710-07 «Раствор стабилизирующий для приготовления растворов химозин- и пепсинсодержащих ФП» и технологическая инструкция). ■

Effect of Stabilizing Solution on Specific Activity and Thermal Stability of Rennet Preparations

Prosekov A. Yu.¹, Grishkova A. V.^{2,3}, Belov A. N.²

¹Kemerovo State University, Kemerovo

²Federal Altai Scientific Center for Agrobiotechnologies, Department of the Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul

³Altai State Medical University, Barnaul

Milk coagulation time is one of the main factors in cheese production as it affects both clot formation and final quality. To control this factor, milk producers apply solutions with a specific pH level as part of milk-converting enzyme preparations before the coagulation stage. This measure ensures a more complete transition of chymosin and pepsin into the solution, activates enzyme preparations, and solves the problem of poor-quality water. In this research, a stabilizing solution increased the milk-clotting activity of enzyme preparations and stabilized them against the thermal treatment during the milk coagulation stage of cheese production. Lower amount of enzyme introduced for milk coagulation purposes could reduce the cheese production costs.

Keywords: milk-converting enzymes, specific (milk-converting) activity, stabilizing solution, thermal stability

Список литературы:

1. Ельчанинов, В. В. Зачем нужно манипулировать структурой натуральных молокосвёртывающих ферментов? / В. В. Ельчанинов // Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока: сборник научных трудов с международным участием. Вып. 6. ГНУ Сибирский НИИ сыроделия СО РАСХН. – Барнаул, 2009. – С. 103–106.
2. Теплы, М. Молокосвёртывающие ферменты животного и микробного происхождения / М. Теплы, Я. Машек, Я. Гавлова – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 272 с.
3. Ельчанинов, В. В. Основные технологические характеристики молокосвёртывающего фермента из сычугов северного оленя / В. В. Ельчанинов [и др.] // Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока: сборник научных трудов с международным участием / ГНУ Сибирский НИИ сыроделия СО РАСХН. – Барнаул, 2005. – С. 130–140.