

Владимир Александрович Пушкарёв^{1, 2}, младший научный сотрудник, аспирант
Ольга Николаевна Мусина^{1, 2}, д-р техн. наук, главный научный сотрудник, доцент
Светлана Валерьевна Беленькая^{3, 4}, канд. биол. наук, научный сотрудник
Дмитрий Николаевич Щербаков^{3, 4}, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник
Анатолий Дмитриевич Коваль¹, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
Александр Николаевич Белов¹, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
Вадим Валентинович Ельчанинов¹, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
¹Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул
²Алтайский государственный технический университет им. И.И.Ползунова, Барнаул
³Алтайский государственный университет, Барнаул
⁴Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

УДК 637.334.2:577.151.6
DOI: 10.31515/2073-4018-2023-2-31-33

Влияние концентрации ионов кальция и pH на молокосвертывающую активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*)

Изучено влияние активной кислотности и концентрации хлорида кальция на скорость коагуляции молока под действием инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) с точечной аминокислотной заменой Lys53→Glu. Установлено, что по зависимости молокосвертывающей активности от pH и концентрации хлорида кальция инженерный рекомбинантный химозин северного оленя сопоставим с высококачественными коммерческими генно-инженерными коагулянтами молока.

Ключевые слова: северный олень, химозин, рекомбинантный химозин, молокосвертывающая активность, pH, хлорид кальция, сыроделие.

Pushkarev V.A.^{1, 2}, Musina O.N.^{1, 2}, Belenkaya S.V.^{3, 4}, Shcherbakov D.N.^{3, 4}, Koval A.D.¹, Belov A.N.¹, Elchaninov V.V.¹ The effect of the concentration of calcium ions and pH on the milk-clotting activity of an engineered variant of recombinant reindeer chymosin (*Rangifer tarandus*)

¹Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul

²Polzunov Altai State Technical University, Barnaul

³Altai State University, Barnaul

⁴State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Novosibirsk region, Koltsovo

The effect of active acidity and calcium chloride concentration on the milk coagulation rate under the action of an engineered variant of recombinant reindeer chymosin (*Rangifer tarandus*) with a point amino acid replacement Lys53→Glu, was studied. It was found that the dependence of milk-clotting activity on pH and calcium chloride concentration of engineered recombinant reindeer chymosin is comparable to high quality commercial genetically engineered milk coagulants.

Key words: reindeer, chymosin, recombinant chymosin, milk-converting activity, pH, calcium chloride, cheesemaking.

Зависимость коагуляционной активности от pH и Ca являются важными технологическими свойствами любого молокосвертывающего фермента (МФ), претендующего на использование в сыроделии [1].

подавляющее большинство производимых в мире сыров вырабатывается из молока, прошедшего термическую обработку. Нормативные документы РФ регламентируют выработку сыров только из пастеризованного молока [2]. При пастеризации молока в нем образуются нераствори-

мые соли фосфата кальция. В результате концентрация ионов кальция снижается, что влечет за собой увеличение продолжительности сычужного свертывания молока и ухудшение реологических характеристик молочного сгустка [3]. Для компенсации эффектов, связанных со снижением концентрации ионов кальция, в пастеризованное молоко вносят CaCl₂ до конечной концентрации 0,1–0,4 г/л (≈1–4 mM) [1, 3, 4].

Стоит учитывать, что с повышением концентрации CaCl₂ в молоке, помимо увеличения коагуляционной активности фермента, также возрастает его общая протеолитическая активность (ПА) [5]. Избыточная ПА коагулянта молока может негативно влиять на физико-химические и органолептические показатели сыров [6]. Поэтому при поиске новых технологических МФ необходимо оценивать чувствительность их молокосвертывающей активности (МА) к изменению концентрации хлорида кальция.

Также важным фактором, влияющим на скорость образования сычужного сгустка, является pH. Приближение значений активной кислотности молока к изоэлектрическим точкам казеинов (pI 4,44–5,80 [7]) снижает отрицательный заряд казеиновых мицелл. В результате ослабевают силы электростатического отталкивания между мицеллами и одновременно усиливаются казеин-казеиновые гидрофобные взаимодействия, что способствует ускорению образования молочного сгустка [8, 3, 9]. При повышении pH отрицательный заряд мицелл увеличивается, и растущие силы электростатического отталкивания препятствуют их сближению, что тормозит образование сычужного сгустка [3].

Другой аспект влияния концентрации ионов водорода на скорость образования сычужного сгустка связан с тем, что рН молочной смеси в момент внесения фермента и рН оптимум химозинов (Хн) не совпадают. Так, по данным портала BRENDA, оптимумы рН различных видов Хн, преимущественно, находятся в диапазоне 3,7–5,5 [<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.23.4#pH%20OPTIMUM>]. Активная кислотность молочной смеси, в момент коагуляции, сдвинута от рН-оптимума фермента в щелочную область и составляет 6,3–6,6. Отсюда вытекает необходимость исследовать зависимость МА любого нового коагулянта от изменения рН молочного субстрата в диапазоне 6–7.

Ранее мы сообщали о получении инженерного варианта рекомбинантного химозина (рХн) северного оленя (*Rangifer tarandus*) с точечной аминокислотной заменой Lys→Glu в положении 53 (рХн-Rta-K53E) [10].

Целью данной работы являлось установление зависимости МА рХн-Rta-K53E от рН молочного субстрата и концентрации в нем CaCl_2 , а также сравнение полученных результатов с показателями натурального МФ из сычужков северного оленя [11].

Материалы и методы

На всех этапах исследования в качестве ферментов сравнения использовали рХн коровы («СНУ-MAX® Powder Extra», сухая форма, для работы готовили 0,5 %-ный водный раствор) и рХн одногорбого верблюда («СНУ-MAX® М 1000», жидкая форма), производства компании Chr. Hansen (Дания). Молокоосвертывающую активность ферментов сравнения нормировали по активности препарата рХн-Rta-K53E.

Зависимость продолжительности коагуляции от рН молока. Для подготовки субстрата в сборное пастеризованное молоко вносили азида натрия до конечной концентрации 0,02 % и готовили аликвоты с рН 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 7,0. Субстрат с различными значениями рН разливали в стеклянные пробирки по 1,25 мл и выдерживали на водяной бане при 35 °С в течение 10 мин. В каждую пробирку с субстратом вносили 0,1 мл исследуемого рХн и определяли продолжительность свертывания, регистрируя появление первых хлопьев коагулянта. Полученный результат выражали в процентах. За 100 % принимали продолжительность свертывания субстрата при рН 6,0. Строили график зависимости продолжительности коагуляции от рН молока.

Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации хлорида кальция в молоке. В качестве субстрата использовали сборное пастеризованное молоко, в которое вносили $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ до конечной концентрации 0,02 % и доводили рН до 6,5. Субстрат разделяли на аликвоты, в которые вносили CaCl_2 до конечной концентрации 1–5 мМ. Субстрат с различными концентрациями CaCl_2 разливали в стеклянные пробирки по 1,25 мл и выдерживали на водяной бане при 35 °С в течение 10 мин. В каждую пробирку вносили 0,1 мл исследуемого рХн и определяли продолжительность свертывания субстрата, как описано выше. Результат определения выражали в

процентах. За 100 % принимали продолжительность коагуляции субстрата, в который CaCl_2 не добавляли. Строили график зависимости продолжительности коагуляции от концентрации CaCl_2 в молоке.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). На графиках не указывали 95 % доверительный интервал, так как значения были меньше 10 % от значений переменных.

Результаты и их обсуждение

Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации хлорида кальция в молоке. Динамика изменения продолжительности свертывания молочного субстрата под действием натурального молокоосвертывающего фермента северного оленя (МФСО) представлена на рис. 1 А. В работе [11] в качестве ферментов сравнения использовали препараты натуральных МФ — отраслевого контрольного образца сычужного фермента (ОКО СФ) и говяжьего пепсина (ГП). Видно, что при увеличении концентрации CaCl_2 специфическая активность ГП и МФСО изменяется одинаково и повышается примерно на 15 % быстрее, чем в случае ОКО СФ. По чувствительности к содержанию хлорида кальция в молоке натуральные ферменты ранжируются следующим образом: МФСО ≈ ГП > ОКО СФ.

При повышении концентрации CaCl_2 в молочном субстрате рХн-Rta-K53E, как и МФСО, увеличивал МА. После внесения в субстрат 1 мМ хлорида кальция, МА всех рХн скачкообразно увеличивалась на 25–30 % (рис. 1 Б). На дальнейшее повышение концентрации CaCl_2 все ферменты реагировали менее активно. По характеру изменения продолжительности коагуляции в зависимости от концентрации хлорида кальция рХн-Rta-K53E ближе к рХн коровы, чем к рХн одногорбого верблюда.

Поскольку графики на рис. 1 Б не пересекаются, можно утверждать, что по чувствительности МА к изменению содержания хлорида кальция в субстрате исследованные ферменты располагаются в следующей последовательности: рХн-Bos > рХн-Rta-K53E > рХн-Cam. Таким обра-

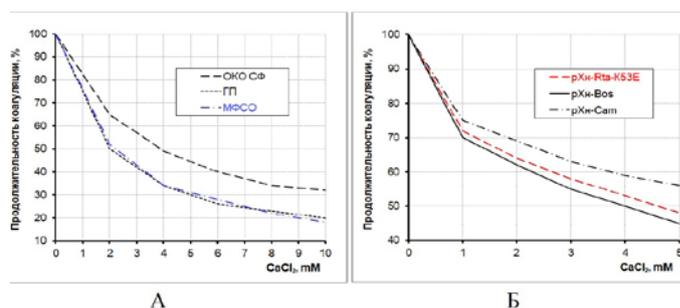


Рис. 1. Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации хлорида кальция для натурального МФ северного оленя (А) [11] и инженерного варианта рХн северного оленя (Б). Условные обозначения: А – ОКО СФ – отраслевого контрольного образца сычужного фермента; ГП – говяжий пепсин; МФСО – молокоосвертывающий фермент северного оленя; Б – рХн-Rta-K53E – инженерный вариант рХн северного оленя; рХн-Bos – рХн коровы; рХн-Cam – рХн одногорбого верблюда

зом, по критерию зависимости МА от концентрации Ca^{2+} , рХн-Rta-K53E полностью соответствует требованиям современного сыроделия, предъявляемым к высококачественным МФ.

Зависимость продолжительности коагуляции от рН молочного субстрата. Увеличение рН молочного субстрата снижает скорость образования молочного сгустка (рис. 2 А). В диапазоне рН 6,1–6,5 МФСО ведет себя так же, как ГП при рН 6,6–6,7, МФСО занимает промежуточное положение между ГП и ОКО СФ, а при значениях рН выше 6,7 — становится похож на ОКО СФ.

В свою очередь, зависимость продолжительности коагуляции от концентрации H^+ в молоке для рХн-Rta-K53E практически совпадает с рХн коровы во всем исследованном диапазоне рН (рис. 2 Б). Рекombинантный фермент верблюда проявлял наименьшую чувствительность к увеличению активной кислотности в диапазоне 6,0–7,0. По чувствительности МА к увеличению рН исследуемые рХн располагаются в следующем порядке: рХн-Vos \approx рХн-Rta-K53E > рХн-Sam. Следовательно, по критерию зависи-

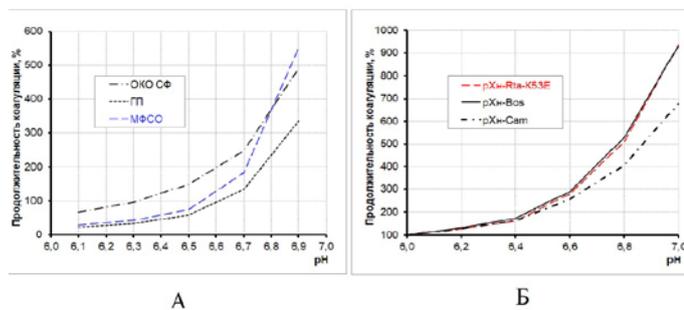


Рис. 2. Зависимость продолжительности коагуляции молочного субстрата от рН для МФ северного оленя (А) [11] и инженерного варианта рХн северного оленя (Б). Условные обозначения: А – ОКО СФ – отраслевой контрольный образец сычужного фермента; ГП – говяжий пепсин; МФСО – молокосвертывающий фермент северного оленя; Б – рХн-Rta-K53E – инженерный вариант рХн северного оленя; рХн-Vos – рХн коровы; рХн-Sam – рХн одногорбого верблюда

мости МА от рН, рХн-Rta-K53E полностью соответствует требованиям современного сыроделия.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что по зависимости молокосвертывающей активности от рН и концентрации хлорида кальция инженерный рекомбинантный химозин северного оленя сопоставим с высококачественными коммерческими генно-инженерными коагулянтами коровьего молока.

Список литературы

1. Belenkaya, S.V. Basic Biochemical Properties of Recombinant Chymosins (Review) / S.V.Belenkaya [et al.] // Applied Biochemistry and Microbiology. 2020. V. 56. № 4. P. 363–372.
2. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013): [Принят решением Совета Евразийской экономической комиссии от 9 октября 2013. № 67]. // ЦНТИ «Медиа-сервис» – Текст: электронный. – URL: <https://docinfo.ru/tr-ts/tr-ts-033-2013/> (дата обращения: 22.11.2022).
3. Lucey, J.A. Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels / J.A.Lucey // J.Dairy Sci. 2002. V. 85. N 2. P. 281–294.
4. Майоров, А.А. Проблемы повышения выхода сыра / А.А.Майоров, И.М.Мироненко, А.А.Байбикова // Сыроделие и маслоделие. 2011. № 2. С. 19–23.
5. Wang, N. Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris* / N.Wang [et al.] // Prot. Expr. Purif. 2015. Vol. 111. P. 75–81.
6. Singh, T.K. Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. / T.K.Singh, M.A.Drake, K.R.Cadwallader // Compr. Rev. Food Sci. Food Safety. 2003. V. 2. № 4. P. 139–162.
7. Farrell, Jr., H.M. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision / H.M. Farrell Jr. [et al.] // J. Dairy Sci. 2004. V. 87. P. 1641–1674.
8. Harboe, M., Broe, M.L., Qvist, K.B. In: Technology of Cheesemaking. Law B.A., Tamime A.Y., Eds., Wiley-Blackwell., 2010, Ch. 3. The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. P. 98–129.
9. Zhao, Z. Effects of pH-modification on the rennet coagulation of concentrated casein micelles suspensions / Z.Zhao, M.Corrédig // Food Chemistry. 2020. V. 316. P. 126–149.
10. Пушкарев, В.А. Молокосвертывающая и общая протеолитическая активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) / В.А.Пушкарев [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2023. № 1. С. 22–25.
11. Ельчанинов, В.В. Исследование молокосвертывающего фермента из сычугов северных оленей: дис. ... канд. техн. наук: 05.18.04: защищена 23.01.06: утв. 07.04.06 / Ельчанинов Вадим Валентинович. – Кемерово, 2006. – 172 с. – Библиогр.: С. 121–147.