

Александр Николаевич Белов¹, канд. техн. наук, старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник
 Анатолий Дмитриевич Коваль¹, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
 Владимир Александрович Пушкарев^{1, 4}, младший научный сотрудник, аспирант
 Анна Владимировна Миронова¹, младший научный сотрудник
 Юлия Геннадьевна Афанасьева¹, младший научный сотрудник
 Дмитрий Николаевич Щербаков^{2, 3}, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник
 Светлана Валерьевна Беленькая³, канд. биол. наук, научный сотрудник
 Дина Владимировна Балабова², старший преподаватель
 Вадим Валентинович Ельчанинов¹, канд. техн. наук, ведущий научный сотрудник
 E-mail: Vpushkarew@mail.ru

¹Федеральный Алтайский научный центр агробιοтехнологий, Сибирский НИИ сыроделия, Барнаул

²Алтайский государственный университет, Барнаул

³Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская область, п. Кольцово

⁴Алтайский государственный технический университет им. И. И. Ползунова, Барнаул

УДК 577.21: 577.15: 637.334.2
 DOI: 10.31515/2073-4018-2023-3-32-34

Апробация рекомбинантного химозина марала при выработке сыра с высокой температурой второго нагревания

Рассмотрены результаты апробации первого отечественного препарата рекомбинантного химозина марала, синтезированного в эукариотической системе экспрессии, при выработке сыра с высокой температурой второго нагревания.

Ключевые слова: сыроделие, химозин, рекомбинантный химозин марала, термостабильность, протеолитическая активность.

**Belov A. N.¹, Koval A. D.¹, Pushkarev V. A.^{1,4}, Mironova A. V.¹, Afanaseva Y. G.¹, Shcherbakov D. N.^{2,3}, Belenkaya S. V. 3, Balabova D. V.², Eychaninov V. V.¹ *Approbation of recombinant maral chymosin in the production of cheese with a high temperature of the second heating*
¹Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Siberian Research Institute of Cheese Making, Barnaul
²Altai State University, Barnaul
³State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rosпотребнадзор, Novosibirsk region, Koltsovo
⁴Polzunov Altai State Technical University, Barnaul**

The results of the approbation of the first domestic preparation of recombinant maral chymosin, synthesized in the eukaryotic expression system, in the production of cheese with a high temperature of the second heating are considered.

Key words: cheesemaking, chymosin, recombinant maral chymosin, thermal stability, proteolytic activity.

Ранее для производства экспериментальных сыров с низкой температурой второго нагревания авторами впервые использован отечественный препарат рекомбинантного химозина (рХн) марала, полученный в системе экспрессии молочных дрожжей *Kluyveromyces lactis* [1]. Интересной особенностью нового фермента была исключительно низкая термостабильность (ТС) с порогом термоинактивации, равным 40 °С, что на 10–15 °С ниже, чем у лучших коммерческих препаратов рХн. В то же время общая протеолитическая активность (ПА) рХн марала (рХн-Ser) оказалась на 12–15 % выше, чем у коммерческого препарата рХн коровы. Апробация, которая проходила в производственных условиях, показала, что опытные и контрольные сыры, выработанные соответственно с рХн

марала и рХн коровы (рХн-Bos), — имели близкие и одинаково высокие органолептические и физико-химические показатели [1]. Таким образом, установлено, что исключительная термолабильность рХн марала, полученного в дрожжевой системе экспрессии, способна компенсировать недостатки, связанные с его повышенной общей ПА, и позволяет успешно использовать новый генно-инженерный фермент при производстве сыров с низкой температурой второго нагревания.

Анализируя результаты первой апробации нового фермента, предположено, что низкая ТС рХн марала позволит применять данный молокосвертывающий фермент (МФ) и при производстве сыров с высокой температурой второго нагревания. Для того чтобы подтвердить (или опровергнуть) данное предположение, была необходима отдельная производственная проверка.

Целью настоящей работы являлось расширение представлений о технологических возможностях нового фермента, в частности — изучение влияния рХн марала на процесс выработки и созревания сыра с высокой температурой второго нагревания.

Материалы и методы

Получение рХн марала в системе экспрессии *K. lactis*. Препарат рХн-Ser, синтезированный в системе *K. lactis*, получали в ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». Конструирование экспрессионного вектора, трансформацию дрожжей *K. lactis* (штамм GG799), культивирование рекомбинантного штамма-продуцента, активацию зимогена и получение рХн марала осуществляли в соответствии с методиками, описанными в работе [2]. В резуль-

тате было наработано около 0,8 л жидкого препарата рХн марала с активностью ≈ 1600 УЕ/мл, который использовали для выработки сыра.

Выработка контрольных и опытных сыров в производственных условиях. Испытывали рХн марала при выработке сыра с высокой температурой второго нагревания в условиях производства ООО «Салаирский МСЗ» (с. Ложкино, Целинный район Алтайского края).

Контрольные и опытные сыры 45 %-ной жирности выработывали в соответствии с действующей НТД на твердый сыр с высокой температурой второго нагревания «Ирбис», формуемый насыпью (ТУ 10.51.40-093-71220805–2021. Сыр «Ирбис»: Технические условия).

В качестве контрольного молокосвертывающего фермента использовали коммерческий рХн коровы «СНУ-МАХ® Powder Extra» (рХн-Bos) компании «Христиан Хансен» (Дания) с заявленной МА 2201 ИМСУ/г (≈ 275000 УЕ/г). Дозу вносимого МФ определяли с помощью кружки ВНИИМС.

Физико-химические показатели молока, молочной смеси и сыворотки контролировали в соответствии с ГОСТ Р 52686–2006. Содержание азотистых соединений в сырах исследовали методом Кьельдаля по схеме И. И. Климовского, летучие жирные кислоты (ЛЖК) определяли по дистилляционному числу [3]. Органолептическую оценку сыров проводили комиссионно по ГОСТ 33630–2015.

Статистическую обработку полученных данных осуществляли в вычислительной среде табличного процессора Excel 2007 (Microsoft Corporation, США). Количественные переменные представлены в виде среднего арифметического (M) с указанием среднеквадратического отклонения ($\pm SD$).

Результаты

Опытные и контрольные сыры выработывали одновременно в параллельных сыроизготовителях. Применяли сборное молоко, которое проходило все необходимые для производства сыров стадии обработки, включая пастеризацию. После обработки молоко имело следующие физико-химические показатели: жир — $3,73 \pm 0,01$ %; кислотность — $17,00 \pm 0,12$ °Т; плотность — $1029,3 \pm 0,1$ кг/м³; белок — $3,29 \pm 0,03$ %.

Смесь для выработки сыра составляли с учетом необходимой жирности сырной массы. В подогретое до температуры свертывания и нормализованное по жиру молоко вносили раствор CaCl₂ из расчета 30 г сухой соли на 100 л смеси, бактериальную закваску мезофильных молочнокислых стрептококков, приготовленную беспресадочным способом из препарата БК-4, закваски термофильного стрептококка, термофильных молочнокислых палочек (ООО «Барнаульская биофабрика», Россия) и прегастральные липазы теленка коровы и козленка (Caglificio Clerici, Италия) (табл. 1). После внесения всех компонентов молочную смесь выдерживали при постоянном перемешивании до увеличения титруемой кислотности на 1 °Т по сравнению с исходным значением.

Установленные количества рХн марала (опыт) и рХн коровы (контроль) вносили в молочную смесь, перемешивали

в течение 5 мин и оставляли в покое до образования сгустка. После внесения коагулянтов, для того чтобы определить готовность формирующегося сгустка к разрезке, периодически контролировали его плотность и способность «отдавать» сыворотку. Первые признаки гелеобразования в контрольной и опытной ванне наблюдались через 15–20 мин после внесения рХн коровы и рХн марала. По мере формирования сгустки быстро уплотнялись с выделением прозрачной, желто-зеленоватой сыворотки.

Увеличение продолжительности формирования сгустка с рХн марала на 2 мин (см. табл. 1) по сравнению с препаратом «СНУ-МАХ® Powder Extra» связано с более высокой кислотностью смеси в контрольной ванне, вызванной исключительно субъективными причинами (небольшая задержка контроля параметров между контрольной и опытной ваннами).

В процессе разрезки и постановки зерна контрольные и опытные сгустки одинаково хорошо уплотнялись и отдавали сыворотку. Продолжительность разрезки и постановки зерна необходимого размера составила около 15 мин и была идентична в обоих вариантах выработки. Дальнейшее вымешивание зерна до второго нагревания занимало в контроле и опыте 40 и 43 мин соответственно. Зерно, как в опытной, так и контрольной ваннах, легко отдавало влагу, хорошо обрабатывалось и одновременно было готово ко второму нагреванию.

Таблица 1

Химико-технологические показатели процесса выработки контрольного и опытного сыров

Показатель	Варианты рХн	
	Контроль рХн коровы (МА ≈ 275000 УЕ/г)	Опыт рХн-Сег (МА ≈ 1600 УЕ/мл)
На 100 кг смеси добавлено:		
хлористый кальций, г	30	30
Бактериальные закваски:		
мезофильная (БК 4), %	1,0	1,0
термофильный стрептококк, %	0,1	0,1
термофильные палочки, %	0,04	0,04
липаза телят, г	0,375	0,375
липаза козлят, г	0,375	0,375
молокосвертывающий фермент	0,9 г	155,0 мл
Кислотность смеси, °Т	18,5	18,0
Температура свертывания, °С	32	32
Продолжительность свертывания, мин	38	40
Обработка до второго нагревания, мин	55	58
Температура второго нагревания, °С	54	54
Продолжительность второго нагревания, мин	28	33
Продолжительность обработки после второго нагревания, мин	20	24
Кислотность сыворотки, °Т:		
после разрезки	13,0	12,0
после раскисления	10,0	9,0
в конце обработки	12,5	12,0
Сыр после прессования:		
активная кислотность, ед. рН	5,56	5,58

Таблица 2

Физико- и биохимические показатели сыров после 90 сут созревания

Препарат	Жир в сухом веществе, %	Активная кислотность, ед. рН	Массовая доля влаги в сыре, %	Массовая доля влаги в обезжиренном веществе, %	Общий белок, %	ЛЖК, %
Опыт (рХн марала)	45,7±0,4	5,61±0,01	38,7±0,4	53,8±0,3	30,1±0,74	9,7±0,2
Контроль (рХн коровы)	43,7±0,7	5,65±0,03	38,2±0,4	52,4±0,3	31,8±0,87	8,9±0,1

Второе нагревание в ванне с препаратом рХн марала проводили в течение 33 мин со средней скоростью 0,6–0,7 °С в минуту до температуры 54 °С. Для выравнивания степени обсушки зерна в обеих ваннах скорость второго нагревания в контроле увеличивали до 0,8 °С в мин. Продолжительность обработки зерна в контрольной и опытной ваннах после достижения температуры второго нагревания составила 20 и 24 мин соответственно.

Показатели изменения кислотности сыворотки, характеризующие развитие молочнокислого процесса в обеих ваннах, были близкими и в конце обработки составляли 12,0–12,5 °Т. В сырах после прессования активная кислотность соответствовала требованиям ТИ, находилась примерно на одном уровне и укладывалась в диапазон 5,56–5,58 ед. рН.

Контрольные и опытные сыры созревали при 13 °С (± 2 °С) в течение 90 сут. На начальном этапе созревания в сырной массе обоих вариантов опыта обнаруживались молочнокислые бактерии в количестве, не превышающем $2,2 \times 10^8$ КОЕ/г. В том числе: мезофильные лактококки — $1,0 \times 10^5$ КОЕ/г, термофильный стрептококк — $1,0 \times 10^7$ КОЕ/г и термофильные молочнокислые палочки — $1,0 \times 10^6$. Бактерии группы кишечных палочек отсутствовали. Основные физико- и биохимические показатели контрольных и опытных сыров после 90 сут созревания имели близкие значения (табл. 2).

Органолептические показатели сыров с высокой температурой второго нагревания, выработанных с рХн марала и «СНУ-МАХ® Powder Extra», имели незначительные отличия и по итогам комиссионной дегустации контрольные и опытные образцы были оценены в 93,29 и 94,29 балла соответственно.

Таким образом, в результате производственной апробации установлено, что сыры с высокой температурой второго нагревания, выработанные с применением рХн марала, по органолептическим и физико-химическим показателям сопоставимы с контрольными сырами, произведенными с применением высококачественного коммерческого коагулянта молока — рХн коровы. Полученные результаты показали, что повышенная (по сравнению с рХн коровы и рХн верблюда) общая ПА рХн алтайского марала полностью компенсируется его экстраординарной термолабильностью и не сказывается на качестве вырабатываемых сыров. Это позволяет говорить об универсальности рХн марала и возможности его применения в качестве промышленного коагулянта молока при производстве любых видов сыров.

Авторы статьи выражают глубокую признательность генеральному директору и главному технологу ООО «Салаирский МСЗ» М. Н. Токареву и А. А. Колесникову за всестороннюю помощь и содействие в организации и проведении выработки экспериментальных сыров.

Список литературы

- Белов, А. Н. Первый опыт применения отечественного рекомбинантного химозина при выработке сыра с низкой температурой второго нагревания/А. Н. Белов [и др.] // Сыроделие и маслоделие. 2022. №3. С. 28–32. DOI: 10.31515/2073-4018-2022-3-28-32
- Беленькая, С. В. Разработка продуцента рекомбинантного химозина марала на основе дрожжей *Kluyveromyces lactis*/С. В. Беленькая, В. В. Ельчанинов, Д. Н. Щербаков // Биотехнология. 2021. Т. 37. №5. С. 20–27.
- Инихов, Г. С. Методы анализа молока и молочных продуктов/Г. С. Инихов, Н. П. Брио. — М.: Пищепромиздат. — 1971. 423 с.