

Научная статья
УДК 637.3

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ МЯГКИХ СЫРОВ

Ю.А. Михайлова^{1,*}, С.С. Бородин¹

¹Ярославская государственная сельскохозяйственная академия, Ярославль, Россия

*E-mail: mihailova@yarcx.ru

Аннотация. Рассмотрены данные о свойствах протеаз, экстрактов растений, способах их получения для коагуляции молока при производстве мягких сыров. С 2004 года создана Нилом Д. Роулингом «MEROPS» – база данных протеолитических ферментов, их субстратов и ингибиторов. По данным «MEROPS», класс аспартаз является вторым по распространенности среди пептидаз растений. Ферменты растительного происхождения являются безопасными и могут быть использованы в пищевой промышленности. Некоторым ограничением выступает сезонность доступности сырья, а также определенные виды растений нецелесообразно использовать в регионах, где они не произрастают. Несмотря на преимущества и разнообразие, не все растительные ферменты могут использоваться для производства мягких сыров в масштабах не крупных производств. Растительные аспартазы очень специфичны и каждый тип требует более подробного изучения, подбора условий, оценки эффективности применения такой замены. В Центральной зоне России наибольшее распространение имеют крапива двудомная (*Urtica dioica*) и чертополох курчавый (*Carduus Crispus*). Поэтому были изучены и исследованы свойства экстрактов из этих растений в качестве коагулянтов белка молока, влияние их на органолептические, физико-химические и текстурные показатели мягких сыров в сравнении с использованием сычужного фермента. Использование экстрактов этих растений в сыроделии способствует получению мягких сыров с пикантным вкусом, более мягкой нежной текстурой и обогащению их витаминами и минеральными веществами.

Ключевые слова: ферменты; протеазы; сычужный фермент; экстракты растений; сыроделие; мягкие сыры.

Для цитирования: Михайлова Ю.А., Бородин С.С. Использование ферментов растительного происхождения в технологии мягких сыров // Вестник науки и образования Северо-Запада России. 2023. Т.9. №2. С. 25–32.

Original article

THE USE OF PLANT-BASED ENZYMES IN SOFT CHEESE TECHNOLOGY

Ju.A. Mikhaylova^{1,*}, S.S. Borodin¹

¹Yaroslavl State Agricultural Academy, Yaroslavl, Russia

*E-mail: mihailova@yarcx.ru

Abstract. Data on the properties of proteases, plant extracts, and methods of their preparation for milk coagulation in the production of soft cheeses are considered. Since 2004, MEROPS, a database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, has been created by Neil D. Rawlings. According to MEROPS, the aspartase class is the second most common among plant peptidases. Enzymes of plant origin are safe and can be used in the food industry. Some

limitation is the seasonality of the availability of raw materials, as well as certain types of plants it is impractical to use in regions where they do not grow. Despite the advantages and diversity, not all plant enzymes can be used for the production of soft cheeses on the scale of small-scale productions. Plant aspartases are very specific and each type requires a more detailed study, selection of conditions, evaluation of the effectiveness of such a replacement. In the Central zone of Russia, the most widespread are dioecious nettle (*Urtica dioica*) and curly thistle (*Carduus Crispus*). Therefore, the properties of extracts from these plants as milk protein coagulants, their effect on the organoleptic, physico-chemical and textural parameters of soft cheeses in comparison with the use of rennet were studied and investigated. The use of extracts of these plants in cheese making contributes to the production of soft cheeses with a piquant taste, a softer delicate texture and their enrichment with vitamins and minerals.

Key words: *enzymes; proteases; rennet enzyme; plant extracts; cheese making; soft cheeses.*

For citation: Mikhaylova Ju.A., Borodin S.S. The use of plant-based enzymes in soft cheese technology. *Journal of Science and Education of North-West Russia*. 2023. V.9. No. 2. pp. 25–32.

Введение

Приблизительно 75% промышленных ферментов относятся к классу гидролаз, среди них протеазы составляют около 60% мировых продаж ферментов. Достаточно привлекательным с экономической точки зрения выглядит использование растительных ферментов, так как спектр проявляющих протеолитическую активность ферментов (аспартаз), обнаруживаемых в различных частях растений многих видов, весьма значителен [1, 2].

Сыры, приготовленные с использованием растительного коагулянта, можно найти в основном в странах Средиземноморья, Западной Африки и Южной Европы.

В Эфиопии научились производить сыр с использованием листьев дынного дерева (*Carica papaya*) и моринги масличной (*Moringa oleifera*) [3].

В Гуандуна (провинция Китая) для коагуляции казеина используются протеазы имбиря и получают молочный творог с имбирным вкусом – Jiangzhuangnai (буквально «молоко для имбиря»). Было обнаружено, что протеазы имбиря с молекулярной массой около 31 кДа существуют в 3 формах со значениями изоэлектрической точки около 5,58; 5,40 и 5,22 рН соответственно. Эти ферменты имели очень похожее биохимическое поведение, проявляя оптимальную протеолитическую активность при температуре от 40 до 60 °С и максимальную активность по свертыванию молока при 70 °С [4, 5].

Довольно перспективно выглядит возможность применения кукумизина (ЕС 3.4.21.25), источником которого являются плоды *Cucumis melo*. Уровень неспецифического протеолиза достаточно невысокий, сопоставим с характерным для препаратов реннина [6].

Целью данного исследования является анализ свойств ферментов класса гидролаз, катализирующие гидролитический разрыв пептидных связей (C–N) и исследование их использования в технологии мягких сыров.

Задачи исследования:

- проанализировать свойства ферментов растительного происхождения и выявить подходящие для использования в технологии мягких сыров;
- провести экспериментальные выработки мягких сыров с использованием ферментов растительного происхождения;
- сравнить мягкие сыры с использованием ферментов растительного происхождения по органолептическим и физико-химическим показателям.

Объекты и методы исследования

Изучение использования ферментов растительного происхождения в технологии мягких сыров начали проводиться с 2019 года на материально-технической базе кафедры «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» ФГБОУ ВО

Ярославская ГСХА. Первый этап исследования при выработке мягких сыров проводили с использованием экстракта крапивы, второй этап – с использованием экстракта чертополоха для коагуляции белка молока. Мягкие сыры оценивались 15 членами дегустационной комиссии по 50-балльной шкале при максимальной оценке: вкус и запах – 20 баллов, консистенция – 10 баллов, внешний вид, цвет, текстура, рисунок, упаковка – 5 баллов в соответствии с ГОСТ 33630-2015. Физико-химические показатели готового продукта оценивали: массовая доля влаги, массовая доля сухих веществ ГОСТ Р 54668-2011, титруемая кислотность ГОСТ Р 54669-2011.

Результаты и их обсуждения

Для получения протеаз с доказанной принципиальной возможностью использования в качестве коагулянтов белков молока применяются следующие растения (таблица 1).

Таблица 1 – Растения, экстракты которых используются для коагуляции белка молока [7]

Русское название	Латинское название
Кардон (артишок)	<i>Cynaria cardunculus</i>
Репейник	<i>Articum minus</i>
Паслен сладко-горький	<i>Solanum dalcamara</i>
Мальва	<i>Malva sylvestris</i>
Чертополох	<i>Carduus crispus</i>
Инжир	<i>Ficus carica</i>
Василек черный	<i>Centurea spp.</i>
Подмаренник	<i>Galum verum</i>
Крапива	<i>Urtica dioica</i>
Амброзия полыннолистная	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>
Лютики	<i>Ranunculus spp</i>
Молочай	<i>Euphorbia lathyrus</i>
Ворсянка	<i>Dipsacus sylvestris</i>
Тысячелистник обыкновенный	<i>Achillea millefolium</i>

Для некоторых из перечисленных растений характерен синтез ферментов подобных животным химозинам по многим параметрам, для других же – образование отличных от реннинов протеаз, которые, однако, имеют достаточную аспартазную активность.

Установлено так же, что экстракты некоторых растений ядовиты, например, гемлок (*Conium maculatum*) и рицин семян клещевины (*Ricinus communis*), которые вызывают комбинированное свертывание с помощью органической кислоты и фермента.

Многие растения производят протеазы (протеолитические ферменты), которые расщепляют пептидную связь между аминокислотами в белках (таблица 2).

Протеазы были разделены на группы на основе каталитического механизма, используемого во время гидролитического процесса. Основными каталитическими типами являются аспарат, серин, цистеин и металлопротеиназы, растительные протеазы, используемые в качестве коагулянтов белка молока, применимы только из первых трех типов и ни одного из металлопротеаз. Сериновые и цистеиновые протеазы каталитически сильно отличаются от аспарагиновых и металлопротеаз тем, что каталитический нуклеофил является частью аминокислоты, тогда как в двух других группах это активированная молекула воды.

Аминокислоты, прилегающие к каталитическому центру, важны для связывания с субстратом и определения гидролизуемой пептидной связи, что обуславливает субстратную специфичность.

Таблица 2 – Протеазы, используемые для гидролиза пищевых белков в промышленности [6, 7]

Тип протеазы	Название	Источник	Диапазон pH	Предпочтительная специфичность ¹
Сериновые протеазы				
животные	Трипсин	Бычий, свиной	7...9	P ₁ : Lys, Arg
	Химотрипсин		8...9	P ₁ : Phe, Tyr, Trp
	Эластаза		6...8	P ₁ : Ala
бактериальные	Subst. arlsberg	<i>Bacillus</i>	6...10	Широкая специфичность, P ₁ – главным образом гидрофобные АК
	Alcalase	<i>licheniformis</i>		
	Subtilisin BPN	<i>Bacillus</i>		
	Subtilisin Novo	<i>amyloliquefaciens</i>		
Цистеиновые протеазы				
растительные	Папаин	Папая latex	5...8	Широкая специфичность, P ₂ – главным образом гидрофобные АК
	Бромелаин	Pineapple stem		
	Фицин	Ficus latex		
Аспарагиновые протеазы				
животные	Пепсин	Свиной, бычий	1...4	P ₁ и P' ₁ – главным образом гидрофобные АК
	Химозин	Телячий	4...6	
грибные	Аналог химозина/химозин-подобный	<i>Mucor pusillus</i> , <i>Mucor miehei</i> , <i>Endothia arasitica</i>		
	Аспергиллопептидаза А	<i>Aspergillus saitoi</i>	2...5	
	Ньюлаза	<i>Rhizopus sp.</i>	3...6	Подобно пепсину
Металлопротеазы				
животные	Карбокси-пептидаза А	Поджелудочная железа	7...8	Терминальные АК на С-конце пептида, кроме Pro, Arg, Lys
бактериальные	Нейтральная протеаза Neutrase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5...7	P' ₁ : Phe, Leu, Val
	Нейтральная протеаза, термолизин	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	7...9	P' ₁ : Ile, Leu, Val, Phe

Примечание. ¹ – P_n и P'_n представляют предпочтительные участки разрыва пептидной связи со стороны карбоксильной и аминогруппы, соответственно.

Обычно ферменты растительного происхождения извлекаются из природного источника путем водной экстракции различных органов растений, таких как цветы, семена, корни и листья. Есть несколько различных способов приготовления водного экстракта растительного материала. Высушенные целые или измельченные цветки *Cynara Cardunculus* замачивают в воде комнатной температуры. Затем фильтрат собирают, и этот неочищенный экстракт используют в качестве коагулянта. Альтернативный метод экстракции – измельчение сушеных цветов с поваренной солью, нанесение пасты на хлопчатобумажную

ткань и растворение ферментов путем пропускания теплого молока. Неочищенный экстракт также может быть дополнительно очищен для получения частично очищенного фермента или чистого фермента в зависимости от степени очистки. Осаждение сульфатом аммония – эффективный способ получения активных протеаз из цветков *Cynara Cardunculus* [8, 9].

Влияние растительных коагулянтов, полученных из листьев крапивы и цветков чертополоха, на свертываемость молока и физико-химические, органолептические и текстурные характеристики мягких сыров было исследовано и представлено в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Органолептическая оценка качества мягких сыров, выработанных с использованием разных экстрактов растений для коагуляции белка молока, в соответствии с ГОСТ 33630-2015

Показатель	Контроль (мягкий сыр, выработанный с сычужным ферментом)	Опытный образец 1 (мягкий сыр, выработанный с коагулянтом из листьев крапивы)	Опытный образец 2 (мягкий сыр, выработанный с коагулянтом из цветков чертополоха, с посолом)	Опытный образец 3 (мягкий сыр, выработанный с коагулянтом из цветков чертополоха, покрытый медом)	Опытный образец 4 (мягкий сыр, выработанный со смесью сычужного фермента и коагулянта из цветков чертополоха в соотношении 1:1)
Внешний вид (1...5 баллов)	5±0,20	4±0,40	3±0,50	4,5±0,30	5±0,40
Цвет и текстура (1...5 баллов)	5±0,40	4±0,60	3,5±0,30	4,5±0,40	5±0,20
Консистенция (1...10 баллов)	7±0,80	6±0,30	5±0,30	6,5±0,70	6,5±0,50
Вкус и запах (1...20 баллов)	20±0,00	18±0,80	18,5±0,70	19±0,50	19,5±0,40
Упаковка (1...5 баллов)	5±0,00	5±0,00	5±0,00	5±0,00	5±0,00
Рисунок (1...5 баллов)	5±0,00	5±0,00	5±0,00	5±0,00	5±0,00
Итого	47±0,80	42±1,20	40,0±0,9	44,5±0,70	46,0±1,10

Мягкий сыр, приготовленный с коагулянтом из цветков чертополоха и посолом, имеет горьковатый вкус. Обладая более сильными протеолитическими действиями, чем химозин, растительные ферменты, экстрагированные из листьев крапивы и цветков чертополоха, приводят к обширному расщеплению казеинов. Более медленная и продолжительная коагуляция белка молока повлияла на текстуру мягкого сыра. Получаются сыры с мягкой маслянистой текстурой, типичным ароматом и слегка пикантным вкусом. Более высокая неспецифическая протеолитическая активность после начала коагуляции связана с нетвердой текстурой сыров из-за более высокой доли кардозинов В, А0 и Р(1) по сравнению с кардозином А. Мягкие сыры, полученные с использованием сычужного фермента, имеют более плотную текстуру и более высокие вкусовые показатели сливочности.

Таблица 4 – Физико-химические свойства и относительный выход мягких сыров, выработанные с использованием разных экстрактов растений для коагуляции белка молока

Показатель	Контроль (мягкий сыр, выработанный с сычужным ферментом)	Опытный образец 1 (мягкий сыр, выработанный с коагулянт из листьев крапивы)	Опытный образец 2 (мягкий сыр, выработанный с коагулянт из цветов чертополоха, с посолом)	Опытный образец 3 (мягкий сыр, выработанный с коагулянт из цветов чертополоха, покрытый медом)	Опытный образец 4 (мягкий сыр, выработанный со смесью сычужного фермента и коагулянта из цветов чертополоха в соотношении 1:1)
Массовая доля влаги, %	59,52	76,54	75,86		60,53
Массовая доля сухих веществ, %	40,48	23,46	24,14		39,47
Титруемая кислотность, °Т	42	64	60		66
Масса цельного молока, кг	1,03	1,03	1,03		1,03
Масса мягкого сыра после самопрессования, кг	0,226	0,154	0,210		0,251
Масса подсырной сыворотки, кг	0,646	0,759	0,600		0,535
Относительный выход мягкого сыра, %	21,9	15,0	20,4		24,4
Изображения образцов сыров					

Более высокая протеолитическая активность в расщеплении казеинов в мягких сырах, выработанных с растительными коагулянтами, привела к более мягкой и кремообразной текстуре, чем у мягких сыров, полученных с использованием сычужного фермента. Упругость не показала существенных различий между разными сырами, в то время как были обнаружены различия в жевательности и липкости. Различия в липкости и жевательности мягких сыров связаны с различиями в содержании массовой доли влаги.

Видно, что более высокий выход мягких сыров был получен при использовании сычужного фермента, а не растительного коагулянта, что может быть связано с протеолитической активностью растительных коагулянтов, ответственных за повышенные потери азота в сыворотке и снижение выхода сыра [10].

Заключение

Растительные экстракты из крапивы двудомной (*Urtica dioica*) и чертополоха курчавого (*Carduus Crispus*) представляют большой интерес для сыродельной промышленности. Исследуемые растительные экстракты обладают неплохой коагулянтной активностью.

В технологии производства мягких сыров с использованием растительных ферментов для коагуляции белка молока использовали норму внесения в пределах 200 мл экстракта крапивы и 50 мл экстракта чертополоха на 1 л теплого молока соответственно.

Растительные ферменты были выделены методом экстрагирования из листьев крапивы и цветков чертополоха и проявляли оптимальную активность при pH 5,5...6,5 для свертывания молока. Мягкие сыры, коагулированные с использованием растительных ферментов, характеризуются мягкой текстурой, особенно коагулированные экстрактом из листьев крапивы – приобретают кремообразную структуру. Вкус у всех образцов мягких

сыров ароматный, кисло-соленый, с отчетливым травянистым послевкусием в зависимости от используемого экстракта растений для коагуляции белка молока.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40. P. 343–350.
2. Федотова А.В. Правильный выбор молокосвертывающих ферментных препаратов – гарантия качества выпускаемых сыров // *Молочное дело.* 2006. № 6. С. 39–45.
3. Горина Т.А. Коагулянты и сычужные ферменты для сыроделия // *Сыроделие и маслоделие.* 2010. № 1. С. 22–23.
4. Шляпникова С.В., Батырова Э.Р. Особенности коагуляции молока: сычужный ферментный препарат и его аналоги // *Биомика.* 2017. №1. С. 33–41.
5. Белов А.Н., Ельчанинов А.Н., Коваль А.Д. Мокосвертывающие препараты // *Молочная промышленность.* 2003. № 2. С. 45–47.
6. Feijoo-Siota L., Villa T.G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications // *Food Bioprocess Technology.* 2011, Vol. 4. P. 1066–1088.
7. García V. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese // *Dairy Science and Technology.* 2012, Vol. 92, No. 6, P. 691–707.
8. Baraka Abo El-Yazeed Abd El-Salam, Osama Abd El-Hamid Ibrahim and Howida Abd El-Razek El-Sayed Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Artichoke (*Cynara cardunculus* L.) Flowers as Coagulant on White Soft Cheese // *International Journal of Dairy Science.* 2017. Vol. 12. P. 254–265.
9. Galan E., Prados F., Pino A., Tejada L., Fernandez-Salguero J. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk // *Int. Dairy J.* 2008. Vol. 18. P. 93–98.
10. Николаев А.М. Технология мягких сыров: учебник. М.: Пищевая промышленность, 1980. 210 с.

REFERENCES

1. Rawlings N.D., Barrett A.J., Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40, pp. 343–350.
2. Fedotova A.V. *Pravil'nyy vybor molokosvertyvayushchikh fermentnykh preparatov – garantiya kachestva vypuskaemykh syrov* [Right choice of milk-converting enzyme preparations is a guarantee of the quality of produced cheeses]. *Molochnoe delo.* 2006. No. 6, p. 39.
3. Gorina T.A. *Koagulyanty i sychuzhnye fermenty dlya syrodeliya* [Coagulants and rennet enzymes for cheese making]. *Syrodelie i maslodeliye,* 2010. No 1, pp. 22–23.
4. Shlyapnikova S.V., Batyrova E.R. *Osobennosti koagulyatsii moloka: sychuzhnyy fermentnyy preparat i ego analogi* [The peculiarities of milk coagulation: rennet enzyme preparation and its analogues]. *Biomika,* 2017. No.1, pp. 33–41.
5. Belov A.N., El'chaninov A.N., Koval' A.D. *Molokosvertyvayushchie preparaty* [Milk-clotting preparations. *Molochnayapromyshlennost'*]. *Molochnaya promyshlennost'.* 2003. No.2, pp. 45–47.
6. Feijoo-Siota L., Villa T.G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. *Food Bioprocess Technol.* 2011. Vol. 4, pp. 1066–1088.
7. García V. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Sci. Technol.* 2012. Vol. 92, No 6, pp. 691–707.



8. . Baraka Abo El-Yazeed Abd El-Salam, Osama Abd El-Hamid Ibrahim and Howida Abd El-Razek El-Sayed Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Artichoke (*Cynara cardunculus* L.) Flowers as Coagulant on White Soft Cheese. International Journal of Dairy Science. 2017. Vol. 12, pp. 254–265.

9. Galan E., Prados F., Pino A., Tejada L., Fernandez-Salguero J. Influence of different amounts of vegetable coagulant from cardoon *Cynara cardunculus* and calf rennet on the proteolysis and sensory characteristics of cheeses made with sheep milk. Int. Dairy J. 2008. Vol. 18, pp. 93–98.

10. Nikolaev A.M. Tekhnologiyamyagkikhsyrov: textbook[Soft cheese technology: textbook]. Moscow: Pishchevaya promyshlennost' Publ., 1980. 210 p.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Михайлова Юлия Александровна – кандидат сельскохозяйственных наук, Ярославская государственная сельскохозяйственная академия (150999, Россия, г. Ярославль, Тутаевское шоссе, д. 58, e-mail: mihailova@yarcx.ru).

Бородин Сергей Сергеевич – магистрант, Ярославская государственная сельскохозяйственная академия (150999, Россия, г. Ярославль, Тутаевское шоссе, д. 58, e-mail: 7860@student.yarcx.ru).

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Mikhailova Yulia Aleksandrovna – Ph.D. (Agricultural), Yaroslavl State Agricultural Academy (150999, Russia, Yaroslavl, Tutaevskoe highway, 58, e-mail: mihailova@yarcx.ru).

Borodin Sergey Sergeevich – Master's student, Yaroslavl State Agricultural Academy (150999, Russia, Yaroslavl, Tutaevskoe highway, 58, e-mail: 7860@student.yarcx.ru).

Статья поступила в редакцию 26.04.2023; одобрена после рецензирования 03.05.2023, принята к публикации 19.05.2023.

The article was submitted 26.04.2023; approved after reviewing 03.05.2023; accepted for publication 19.05.2023.