

Владимир Александрович Пушкарев^{1, 2}, младший научный сотрудник, аспирант
 Ольга Николаевна Мусина^{1, 2}, д-р техн. наук, главный научный сотрудник, доцент
 Светлана Валерьевна Беленькая^{3, 4}, д-р техн. наук, главный научный сотрудник, доцент
 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

Влияние концентрации ионов кальция и рН 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, Koval A.D¹, Belov A.N.¹, Elychaninov 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 Rosпотребnadzor, 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), пред倾向ящего 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 сырчужного свертывания молока и ухудшение реологических характеристик молочно-го сгустка [3]. Для компенсации эффектов, связанных со снижением концентрации ионов кальция, в пастеризованное молоко вносят CaCl_2 до конечной концентрации 0,1–0,4 г/л (\approx 1–4 mM) [1, 3, 4].

Стоит учитывать, что с повышением концентрации CaCl_2 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 сырчужного 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 сырчужного сгустка [3].

Другой аспект влияния концентрации ионов водорода на скорость образования сычужного сгустка связан с тем, что pH молочной смеси в момент внесения фермента и pH оптимум химозинов (X_h) не совпадают. Так, по данным портала BRENDA, оптимумы pH различных видов X_h 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 pH-оптимума фермента в щелочную область и составляет 6,3–6,6. Отсюда вытекает необходимость исследовать зависимость MA любого нового коагулянта от изменения pH 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 MA рХн-Rta-K53E от pH молочного субстрата и концентрации в нем CaCl_2 , а также сравнение полученных результатов с показателями натурального МФ из сычугов северного оленя [11].

Материалы и методы

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

Зависимость продолжительности коагуляции от pH молока. Для подготовки субстрата в сборное пастеризованное молоко вносили азида натрия до конечной концентрации 0,02 % и готовили аликовты с pH 6,0; 6,2; 6,4; 6,6; 7,0. Субстрат с различными значениями pH разливали в стеклянные пробирки по 1,25 мл и выдерживали на водяной бане при 35 °C 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 pH 6,0. Строили график зависимости продолжительности коагуляции от pH молока.

Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации хлорида кальция в молоке. В качестве субстрата использовали сборное пастеризованное молоко, в которое вносили NaN_3 до конечной концентрации 0,02 % и доводили pH до 6,5. Субстрат разделяли на аликовты, в которые вносили CaCl_2 до конечной концентрации 1–5 mM. Субстрат с различными концентрациями CaCl_2 разливали в стеклянные пробирки по 1,25 мл и выдерживали на водяной бане при 35 °C 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 молокосвертывающего фермента северного оленя (МФСО) представлена на рис. 1 А. В работе [11] в качестве ферментов сравнения использовались 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 mM 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-K53Е 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-

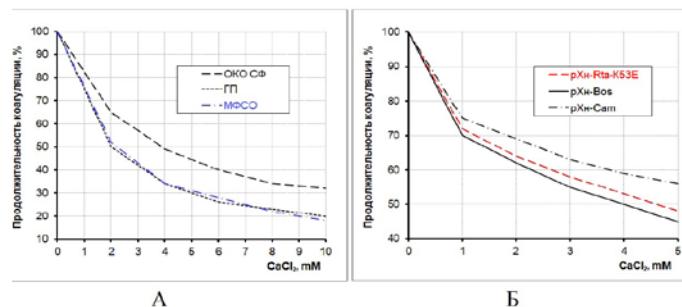


Рис. 1. Зависимость продолжительности коагуляции от концентрации хлорида кальция для натурального МФ северного оленя (А) [11] и инженерного варианта рХн северного оленя (Б). Условные обозначения: А – ОКО СФ – отраслевой контрольный образец сычужного фермента; ГП – говяжий пепсин; МФСО – молокосвертывающий 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 pH молочного субстрата. Увеличение pH молочного субстрата снижает скорость образования молочного сгустка (рис. 2 А). В диапазоне pH 6,1–6,5 МФСО ведет себя так же, как ГП при pH 6,6–6,7, МФСО занимает промежуточное положение между ГП и ОКО СФ, а при значениях pH 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 pH (рис. 2 Б). Рекомбинантный фермент верблюда проявлял наименьшую чувствительность к увеличению активной кислотности в диапазоне 6,0–7,0. По чувствительности МА к увеличению pH исследуемые рХн располагаются в следующем порядке: рХн-Bos ≈ рХн-Rta-K53E > рХн-Cam. Следовательно, по критерию зависи-

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

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

Список литературы

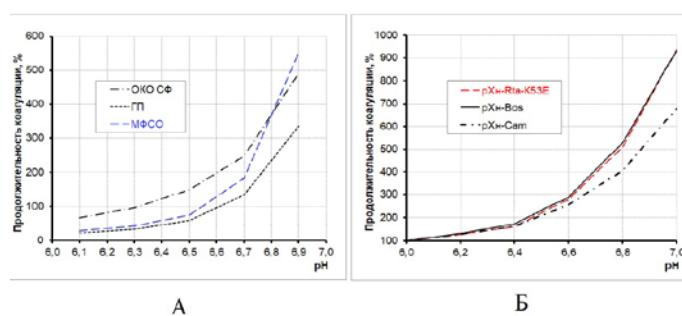


Рис. 2. Зависимость продолжительности коагуляции молочного субстрата от pH для МФ северного оленя (А) [11] и инженерного варианта рХн северного оленя (Б). Условные обозначения: А – ОКО СФ – отраслевой контрольный образец сычужного фермента; ГП – говяжий пепсин; МФСО – молокоусврывающий фермент северного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

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.Correrig // Food Chemistry. 2020. V. 316. P. 126 –199
10. Пушкарев, В.А. Молокоусврывающая 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 молокоусврывающего 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.