

УДК 637.3

*В.П. Вистовская***Гидролитические ферменты в биотехнологии сыра***V.P. Vistovskaya***Hydrolytic Enzymes in Cheese Biotechnology**

Рассматриваются различные ферменты из класса гидролаз, которые участвуют в производстве сыров. Дана краткая характеристика биохимических свойств некоторых из них.

**Ключевые слова:** гидролазы, биохимические характеристики, молоко, сыр.

Гидролитические ферменты (гидролазы), катализирующие расщепление сложных органических соединений на более простые с участием воды, активно используются в производстве сыров. Благодаря действию гидролаз сыр приобретает характерный вкус и аромат. Источники гидролаз в сыре можно условно разделить: 1) энзимы сырого молока, не теряющие своей активности даже после термообработки; 2) ферменты, намеренно вносимые в молочную смесь для свертывания молока и ускорения созревания сыра; 3) ферментные системы молочнокислых бактерий. В ферментативных превращениях составных частей молока, а далее и сырной массы участвует достаточно большое количество гидролитических ферментов. Одним из первых представителей класса гидролаз подкласса эстераз является липаза.

Триацилглицерол-ацилгидролаза Н.Ф.3.1.1.3 (тривиальное название липаза, стеапсин) действует на сложноэфирные связи, катализируя гидролиз триглицеридов молочного жира. Большинство липаз обладает позиционной специфичностью. Так, липаза молока катализирует отщепление жирных кислот преимущественно в 1 и 3-м положениях с образованием 1,2- и 1,3-диглицеридов или моноглицеридов. Липаза молока, молекулярная масса которой примерно 7000 Да, имеет оптимум pH 9,0–9,2 при гидролизе молочного жира. Необходимо отметить, что в сыром молоке присутствует липаза нативная и микробиальная; если нативные ферменты молока синтезируются из элементов крови, лейкоцитов или альвеолярных клеток вымени, то микробиальные присутствуют в выдоенном молоке вследствие жизнедеятельности микроорганизмов. Существует мнение, что некоторые гидролитические ферменты, в том числе и липазы, специально секретруются клетками молочной железы для оказания помощи новорожденному в усвоении питательных веществ молока.

The study considers various enzymes from a hydrolases class which participate in cheeses' production. The short characteristic of biochemical properties of some of them is given.

**Key words:** hydrolases, biochemical characteristics, milk, cheese.

Количество нативной (истинной) липазы в нормальном молоке незначительно. Фермент связан главным образом с казеином и иммуноглобулинами (плазменная липаза), и лишь небольшая часть его (от 1 до 10%) адсорбирована оболочками жировых шариков (мембранная липаза) [1, 2].

В результате механической, температурной обработки (охлаждение) в молоке происходит повреждение оболочек жировых шариков, что приводит к их дестабилизации, при этом перераспределяется липаза с белков на оболочку жировых шариков. Подобное перераспределение приводит к гидролизу жира, выделяются свободные жирные кислоты (масляная, капроновая, каприловая и др.), которые становятся доступными для микробных липаз, вызывающих липолиз. Как правило, прогорклый вкус молока и молочных продуктов вызывает липаза, выделяемая посторонней микрофлорой молока – психротрофными микрококками. Температурная обработка молока (охлаждение) способствует процессу липолиза, поскольку изменяет состав микрофлоры молока – начинают преобладать психротрофные бактерии, способные размножаться даже при низких температурах [3].

Липаза нативная инактивируется при температуре 60 °С с выдержкой 20 мин, а также при 74–80 °С, бактериальная – при 85–90 °С. Нативная липаза теряет активность при температуре хранения молока от 0 до 5 °С через 48 часов, но при повышении титруемой кислотности молока и молочного жира активность ее возрастает. Температурные режимы обработки молока при выработке сыров способствуют инаktivации нативной липазы, чего нельзя сказать о бактериальной липазе, отличающейся термостабильностью [4].

Для ускорения созревания сыра в молоко после термообработки или в сырную массу вносят липазу, которая активизирует липолитические процессы.

Опыты с выработкой сыра «Чеддер» из сырого и пастеризованного молока в асептических условиях показали, что природная липаза молока при выработке сыра из сырого молока повышает степень липолиза на 15–20%. Добавление к молоку выделенной из сырого молока липазы привело к увеличению содержания в опытных сырах свободных жирных кислот [5].

В основном липазу получают из натуральных источников – желудков молодых животных. Различают несколько типов липаз:

- полученная от телят – создает деликатный и мягкий пикантный аромат, который хорошо заметен и похож на запах масла, только более пряный;
- полученная от коз – имеет острый, стойкий пряный аромат;
- полученная от овец – сильный аромат, чувствуется во рту, средней пряности;
- из смеси овечьего и козьего – очень острый привкус;
- получаемая из грибов – для любителей вегетарианских сыров [6].

В результате направленного липолиза в готовом продукте накапливаются свободные жирные кислоты, диацилглицерины, играющие роль пластификаторов и влияющие на консистенцию сыра. Ряд исследователей доказывают использование прегастральной липазы телят как активатора липолитических процессов, в результате которых готовый продукт характеризуется высокими органолептическими показателями.

Ферментные системы микроорганизмов, участвующих в производстве сыра, также содержат липазу. Для усиления липолитических процессов в сырах осуществляют подбор штаммов заквасочной микрофлоры с высокой липолитической активностью, хотя использование липаз заквасочной микрофлоры недостаточно эффективно в силу низкой активности фермента [7].

Несмотря на успешное применение липазы в биотехнологии сыров, в том числе выработанных и российскими производителями, в настоящее время в Российской Федерации использование липазы (Е 1104) запрещено, хотя украинские производители сыров используют данную биологическую добавку и успешно реализуют свою продукцию, в том числе и на территории России.

В отличие от липаз, действующих на эфиры карбоновых кислот, фосфатазы расщепляют эфиры фосфорной кислоты. В свежесываемом молоке обнаружены щелочная фосфатаза (Н.Ф. 3.1.3.1) с оптимумом рН 9,6 и незначительное количество фосфопроteid-фосфатазы (Н.Ф. 3.1.3.2), связанной с альбуминовой фракцией молока с оптимумом рН около 5 (кислая фосфатаза).

Работа Л.В. Валовой, О.И. Курлмановой (1987) свидетельствует об изменении активности щелочной и кислой фосфатазы в зависимости от физиологиче-

ского состояния животного. Высокий уровень активности ферментов наблюдался в молозиве первых суток лактации, что, вероятно, связано с накоплением ферментов в молочной железе перед отелом и в связи с эволюционно отработанной необходимостью максимальной защиты новорожденных в 1-е сутки жизни. Активность ферментов в молоке увеличивалась на 2–3 и 5–6 месяцах лактации, а также возрастала к концу лактационного периода в связи с подготовкой организма к новому отелу [8].

Щелочная фосфатаза попадает в молоко из клеток молочной железы, концентрируясь на оболочках жировых шариков, но может вырабатываться микрофлорой молока (*E. coli* и др.). Щелочная фосфатаза кишечной палочки имеет молекулярную массу 94000 Да, состоит из двух одинаковых субъединиц, каждая из которых имеет активный центр, но сама по себе она неактивна. Активные центры находятся в молекуле фермента друг от друга на расстоянии 3 нм. В каждом активном центре есть три участка связывания ионов двухвалентных металлов: первый связывает  $Zn^{2+}$ , второй –  $Zn^{2+}$  или  $Mg^{2+}$ , третий –  $Mg^{2+}$ . Гидролиз субстрата включает стадию фосфорилирования остатка серина активного центра с последующим отщеплением фосфата под действием воды, входящей в координационную сферу  $Zn^{2+}$  первого центра. Общую скорость реакции лимитирует выход фосфата из активного центра, ускоряемый его взаимодействием с ионом металла, находящимся во втором центре. Функционирование фосфатаз сопровождается конформационными перестройками молекулы, которые обуславливают взаимодействие активных центров.

Кислая фосфатаза представляет собой смесь трех основных разновидностей ферментов, обозначаемых римскими цифрами II, III, IV. В паренхиматозных органах локализуется фосфомоноэстераза III, оптимум рН 3,4–4,4; фосфомоноэстераза IV с оптимумом рН 5,2–6,2 обнаружена в эритроцитах.

Стабильные к нагреванию кислые фосфатазы инактивируются при температуре выше 90 °С, в то время как щелочные фосфатазы теряют активность при нагревании до 62 °С в течение 30 мин и при 72 °С в течение 15 мин. Известно, что нативная фосфатаза молока может восстанавливать свою активность после кратковременной высокотемпературной пастеризации, случаи реактивации фосфатазы наблюдаются в основном после обработки высокожирного сыра.

Амилаза, как представитель класса гидролаз, в молоке содержится в форме  $\alpha$ -амилазы (1,4- $\alpha$ -D-глюкан глюканогидролаза Н.Ф. 3.2.1.1), связана с  $\beta$ -лактоглобулиновой фракцией молока.  $\beta$ -амилаза (1,4- $\alpha$ -D-глюкан мальтогидролаза Н.Ф. 3.2.1.2) обнаружена в молоке лишь отдельных животных.  $\alpha$ -амилаза катализирует расщепление полисахаридных цепей

крахмала с образованием декстринов и малого количества мальтозы. Характерной особенностью всех  $\alpha$ -амилаз является наличие в них по крайней мере одного моля прочно связанного кальция на моль фермента. Кальций стабилизирует вторичную и третичную структуру молекулы  $\alpha$ -амилазы, обеспечивая ее каталитическую активность и предохраняя фермент от действия протеолитических ферментов. Количество амилазы в молоке повышается при заболевании животных. Фермент имеет оптимум действия при pH 7,9, инактивируется при пастеризации.

К подклассу 3.2, который включает гидролазы, гидролизующие гликозильные соединения, относится лактаза ( $\beta$ -галактозидаза). Лактаза ( $\beta$ -D-глюкозид галактогидролаза Н.Ф. 3.2.1.23) катализирует реакцию гидролитического расщепления лактозы на моносахариды: глюкозу и галактозу. Клетки молочной железы лактазу практически не синтезируют, ее вырабатывают молочнокислые бактерии и дрожжи некоторых форм. Оптимальное действие лактазы при pH 5,0. Амилаза и лактаза инактивируются при термообработке даже при очень мягких температурных режимах, используемых в технологии сыров; процесс реактивации для этих ферментов не описан.

Протеолитические ферменты (Н.Ф.3.4), катализирующие гидролиз пептидов и белков, имеют огромное значение в производстве сыров.

Протеиназы в молоке обнаружены нативные и бактериальные, которые отличаются строением каталитического центра. Все они вызывают гидролиз пептидных связей белков молока в основном  $\alpha$ - и  $\beta$ -казеина, образуя пептоны, пептиды и аминокислоты. В 1890 г. Бабкоком установлено, что нативная протеиназа молока – плазмин, синтезируемый в крови животного, расщепляет в молоке  $\beta$ -казеин, давая начало  $\gamma$ -казеинам и протеозо-пептонным компонентам. В 1971 г. в модельных опытах показано, что протеиназа молока может локализоваться как на  $\alpha_{s1}$ , так и  $\beta$ -казеине, подвергая их гидролизу с высвобождением полипептидов и аминокислот. При действии протеиназы молока на  $\alpha_{s1}$ -казеин получают фракции, отличающиеся по электролитической подвижности от исходного  $\alpha_{s1}$ -казеина, а при гидролизе  $\beta$ -казеина обнаруживаются фракции с низкой, нулевой и отрицательной электрофоретической подвижностью. Позднее W. Eigel установлено, что плазмин не затрагивает  $\kappa$ -казеин и полностью деградирует  $\alpha_{s1}$ -В-казеин с образованием одной полипептидной зоны с несколько меньшей, чем у  $\alpha_{s1}$ -В-казеина, электрофоретической подвижностью и нескольких зон с более высокой электрофоретической подвижностью. Две из более подвижных зон содержат фосфор, а у трех, наиболее быстрых, определены молекулярные массы 20500, 12300 и 10300 Да.

При изучении протеолиза высокоочищенных образцов  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинов свиным плазми-

ном и коровьим плазминогеном с урокиназой, а образцов протеозо-пептонов, выделенных из свежего и хранившегося сырым и пастеризованным молоком, а также полученных в ходе естественного протеолиза молока его ферментами при хранении, описывают 38 компонентов, которые обнаруживались при одном электрофоретическом разделении. Почти все эти компоненты были фрагментами казеинов, получающимися при расщеплении казеинов плазмином молока с преобладанием продуктов гидролиза  $\alpha_{s1}$ - и  $\beta$ -казеина. Многие компоненты протеозо-пептонов являются результатом протеолиза, состав протеозо-пептонов меняется в зависимости от происхождения, состояния, продолжительности и температуры хранения молока. Процесс протеолиза  $\beta$ -казеина и других казеинов плазмином может происходить *in vivo*, т.е. уже в вымени животного. Так, ирландские исследователи при изучении в течение года состава казеина в молоке обнаружили, что в последнем квартале года, который совпадал с концом лактации, снижалось содержание  $\alpha_{s1}$ - и  $\beta$ -казеина и возрастало количество  $\kappa$ -,  $\gamma$ - и минорных компонентов казеина. Использование меченого по  $^{14}\text{C}$   $\beta$ -казеина позволило сделать вывод, что изменения в составе казеина в конце лактации происходят, в основном, в результате активизации протеолиза субъединиц казеина под действием протеиназы типа плазмина. Также установлено увеличение протеиназной активности в молоке, полученном от коров, больных маститом, что зависит от степени тяжести инфекции и поражения тканей молочной железы. В молоке с высоким содержанием соматических клеток обнаружено десятикратное увеличение активности протеиназы по сравнению с нормальным молоком [9].

Нативная протеиназа молока близка по строению к плазме крови и из нее попадает в молоко. Она вызывает гидролиз  $\beta$ -казеина с образованием  $\gamma$ -казеина. Фермент инактивируется при 70 °C 10 мин или 90 °C – 5 мин.

Бактериальная протеиназа вырабатывается микрофлорой молока – микрококками, гнилостными бактериями, которые выделяют активные протеиназы, вызывающие различные пороки вкуса и запаха.

Лизоцим (мурамидаза) гидролизует связи в полисахаридах клеточных стенок бактерий и вызывает их гибель. Наряду с другими антибактериальными факторами лизоцим обуславливает бактерицидные свойства молока. Коровье молоко содержит небольшое количество лизоцима – в среднем 13 мкг в 100 мл. Лизоцим выделен из молока в чистом виде, изучены его физико-химические, иммунохимические свойства, аминокислотный состав. Он является основным белком с молекулярной массой 18000 и оптимумом действия при pH 7,9, термостабилен в кислой среде; лизоцим принадлежит к группе иммуномодуляторов [9–10].

### Библиографический список

1. Нечаев А.П., Траубенберг С.Е., Кочеткова А.А. и др. Пищевая химия. – СПб., 2007.
2. Кретович В.Л. Введение в энзимологию. – М., 1986.
3. Шидловская В.П., Юрова Е.А. Антиоксиданты молока и их роль в оценке его качества // Молочная промышленность. – 2010. – №2.
4. Шидловская В.П. Ферменты сырого молока и их роль в оценке его качества // Молочная промышленность. – 2009. – №1.
5. Природные энзимы молока для твердых сыров (часть 3) // Syrodelie. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.brazilwaxing.org>.
6. Липаза. Сыр своими руками. Все для сыроделов-любителей. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.cheeasy.ru>.
7. Кригер А.В., Белов А.Н. Влияние прегастральной липазы на созревание сыра // Сыроделие и маслоделие. – 2010. – №5.
8. Итэсь Ю.В., Храмцов В.В., Магер С.Н., Паршина О.Н. Биохимический статус крупного рогатого скота разного возраста. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.laboratorium.narod.ru>.
9. Горбатова К.К., Иванова С.А., Гунькова П.И. Нативные протеиназы молока // Применение искусственного холода, физико-химических и биологических средств для повышения качества сохраняемости пищевых продуктов: межвуз. сб. науч. тр. – СПб., 1996.
10. Келли А.Л. Фокс П.Ф. Нативные ферменты молока // Молочная промышленность. – 2007. – №6.