

Б.І. Галух, асист. (ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького, Львів)
Г.В. Дроник, д-р біол. наук, академік НААНУ, проф. (Буковинський
НДІ агропромислового виробництва, Чернівці)

ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІЗУ БІЛКІВ ПІД ЧАС ВИГОТОВЛЕННЯ БРИНЗИ З МОЛОКА РІЗНИХ ВИДІВ ТВАРИН

Досліджено біохімічні процеси протеолізу α - і β -казеїнів та утворення пептидів під час виробництва розсольного сиру бринзи з молока корів, овець, кіз і їх сумішей в умовах передгірського і гірського регіону Західної України, за умов застосування нової технології виробництва бринзи, а також її вплив на процес протеолізу під час виробництва та дозрівання бринзи.

Исследованы биохимические процессы протеолиза α - и β -казеинов, и процессы образования пептидов при производстве рассольного сыра брынзы из молока коров, овец, коз и их смесей в условиях предгорного и горного регионов Западной Украины, при использовании новой технологии производства брынзы, а также ее влияние на процесс протеолиза при производстве и созревании брынзы.

There was investigated biochemical processes of α - and β -caseins protheolysis as well as peptides formation at producing white brine cheese Brynza from both cows, sheep, goats milk and their mixture under conditions of Carpathian region of Western Ukraine. A new technology of white brine cheese production and its affect on protheolysis process at white brine cheese production and ripening has been proposed.

Постановка проблеми у загальному вигляді. Протеоліз – важливий біохімічний процес під час дозрівання різних видів сирів, який сприяє формуванню консистенції і смаку сиру. Протеоліз молочних білків, головним чином, казеїну, відбувається під дією ферментів молокозгортальних препаратів, бактеріальних заквасок, мікрофлори молока, плазміну-нативного ферменту молока [1].

Під час використання сичужного ферменту (хімозину) зміни казеїну починаються під час утворення згустку, коли казеїн перетворюється в параказеїн. Після згортання молока сичужний фермент розщеплює більшим чином α_{s1} -казеїн порівнянно з β -казеїном, тому, що перший має більшу кількість чутливих до хімозину зв'язків [2; 3]. При цьому відбувається неглибокий розпад казеїну з утворенням довголанцюгових і середньоланцюгових пептидів і пептонів.

Термостабільний нативний фермент молока плазмін розщеплює переважно β -казеїн з утворенням протеозо-пептонної фракції (γ -казеїнів), та меншим чином α_s і κ -казеїни [4; 5]. Проте у розсольних сирах активність

плазміну не є високою внаслідок низької кислотності і високої концентрації солі в розсолі. Подальший розпад β -казеїну здійснюється мікробними протеазами [6; 7].

Протеолітична система молочнокислих бактерій, зокрема протеїнази, що беруть участь у гідролізі казеїну, а також довголанцюгових пептидів, та протеїнази, що беруть участь у вивільненні (утворенні) малих пептидів та вільних амінокислот. Цей процес є невід'ємним кроком під час дозрівання сиру [8; 9].

Розсолні сири, до яких належить і бринза, є специфічною категорією сирів, головною особливістю яких є дозрівання і зберігання в розсолі. Традиційно бринзу в умовах передгірського і гірського районів Карпат виготовляють з непастеризованого молока, тому що не завжди є можливість її виробництва в умовах молокопереробних підприємств. Проте, досить важливим є дотримання суворого контролю за якістю сировини під час виробництва і дозрівання бринзи. Крім того, підбір бактеріальних культур і оптимізація технології виробництва – один із найважливіших аспектів під час виробництва високоякісної бринзи. Традиційно бринзу виготовляють із застосуванням сичужного ферменту сичуга телят або ягнят. На промисловому рівні використовують закваски до складу яких входять термофільні, мезофільні та поєднання термофільних і мезофільних культур [10].

Дослідження впливу культур бактеріальних препаратів, які використовуються під час виробництва сиру бринза, одного з представників групи розсолних сирів, та поєднання їх з новими технологіями на даний час не достатньо систематизовані [11; 12].

Мета та завдання статті. У проведених нами дослідженнях вивчався вплив суміші термофільних і мезофільних культур, та використання нової технології виробництва на перебіг протеолітичних процесів під час виробництва та дозрівання сиру бринза з молока корів, овець, кіз та їх сумішей.

Удосконалення технології виробництва бринзи проводили в умовах фермерських господарств: СВС „Сервіс” с. Костичани та с. Малинівка Новосельського району Чернівецької області, а також с. Устеріки Верховинського району Івано-Франківської області.

Згідно з існуючими вимогами ДСТУ 3762-97 у молоці визначали: густину, кислотність, чистоту, масову частку жиру, масову частку білка, масову частку лактози, вміст сухих речовин. Густину, вміст білка, вміст жиру та СЗМЗ визначали на апараті „Екомілк”.

Розділення казеїнів та продуктів їхнього розщеплення у бринзі проводили методом електрофорезу у поліакриламідному гелі (метод Леммлі у модифікації з введенням у гель сечовини) [13]. Підготовку зразків здійснювали шляхом знежирення гексаном подрібнених зразків сирної маси, висушування білка та розчинення його у трис-НСІ буфері рН 8,3 з дисульфаном натрію та β-меркаптоетанолом.

Виготовлення контрольних зразків бринзи проводили відповідно до традиційної технології, що передбачена РСТ УССР 1602-82.

Під час виготовлення дослідних зразків сиру, перед внесенням бактеріального концентрату для покращення якості бринзи його активізували наступним чином. У молоко підготовлене для виробничої заправки вносили бактеріальний концентрат, що складався з культур: *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* у кількості 1 г сухого порошка на 100 кг молока (суміші), попередньо активізувавши його у знежиреному стерилізованому й охолоджену до температури $32\pm 1^\circ\text{C}$ коров'ячому молоці.

Як молокозгортальний фермент використовували ферментативний препарат „Махірен 1800”, фірми DSM Food Specialties (Нідерланди). Його вносили в молоко (суміш), попередньо розчинивши в кип'яченій і охолодженій до $30\text{...}32^\circ\text{C}$ воді, з розрахунку 1 г препарату на 100 кг молока (суміші).

Доза хлориду кальцію становила 30 г 40%-го водного розчину солі на 100 кг молока.

Одержане молоко спочатку очищували і нормалізували за вмістом жиру. Пастеризацію проводили за температури $74\pm 2^\circ\text{C}$ з витримкою 20 с.

Бактеріальний препарат, хлорид кальцію і „Махірен” вносили в молоко за температури $32\pm 1^\circ\text{C}$, ретельно перемішували помішувачем протягом 2...3 хв. Через 20 хв спостерігалось утворення згустку, а через 30...35 хв згусток вважався готовим. Далі розрізали згусток до розмірів сирного зерна 5...10 мм і залишали в спокої на 10...15 хв для відділення сироватки. Готовність згустку після розрізання визначали за тим, як сирне зерно опускалось на дно сироробної ванни, а сироватка спливала зверху. Наступна операція – це відділення сироватки і самопресування протягом 10...12 год та пресування 2...3 год.

Готовий відпресований сирний згусток (будз) розрізали на шматки товщиною 5...6 см і занурювали в попередньо приготовлений розсіл (водний розчин кухонної солі) 22...24% концентрації.

Температура розсолу не перевищувала 10...12° С. Підвищену концентрацію розсолу вибрали для пришвидшення проникнення солі з розсолу в сирну масу, тобто, покращенню процесу дифузії солі в сирну масу.

На п'ятий день проводили заміну розсолу, на розсіл нижчої концентрації: 14...15%. Проте, це не призводило до збільшення концентрації солі в готовому продукті, яка становила 4...6%.

Виклад основного матеріалу дослідження. У результаті проведених досліджень встановлено цілу низку особливостей перебігу процесів протеолізу різних фракцій казеїну молока та нагромадження продуктів їх розпаду під час визрівання бринзи, виготовленої з коров'ячого, овечого, козиного молока та їх сумішей (рис. 1-2).

Як показали дослідження фракційного складу казеїну бринзи, за умов практично однакового вмісту казеїну в усіх зразках бринзи спостерігалися різниці у співвідношенні α - і β -казеїнів. Після пресування порівняно з бринзою із коров'ячого молока, бринза із овечого і козиного молока містила відповідно в 1,52 і 1,94 рази менше α -казеїну, та 1,44 і 1,66 рази більше β -казеїну. Це відповідає вмісту цих фракцій казеїну в молоці корів, овець і кіз. У бринзі із сумішей коров'ячого й овечого, коров'ячого і козиного молока ці різниці були дещо меншими.

Встановлено помітні відмінності в швидкості (ступені) деградації окремих фракцій казеїну залежно від особливостей фракційного складу використаного молока для виготовлення бринзи та технології її виготовлення. Якщо вміст окремих фракцій казеїну після пресування бринзи прийняти за 100%, то в зрілій 20-денній бринзі, виготовленій із коров'ячого, овечого, козиного молока і суміші коров'ячого й овечого та суміші коров'ячого і козиного молока вміст α -казеїну складав в контрольній коров'ячій бринзі – 76,1%, в коров'ячій дослідній бринзі – 71,4%, овечій бринзі – 82,2%, козиній бринзі – 90,7%, коров'ячо-овечій – 76,8%, коров'ячо-козиній – 81,0% ($P < 0,01$).

Менш інтенсивно відбувалася деградація β -казеїну, що зумовлено меншою кількістю в складі його пептидних ланцюгів споріднених до хімозину зв'язків [14]. Як і у випадку з α -казеїном спостерігалися певні відмінності у ступені гідролізу β -казеїну в бринзі, виготовленій із досліджуваних видів молока або їх сумішей.

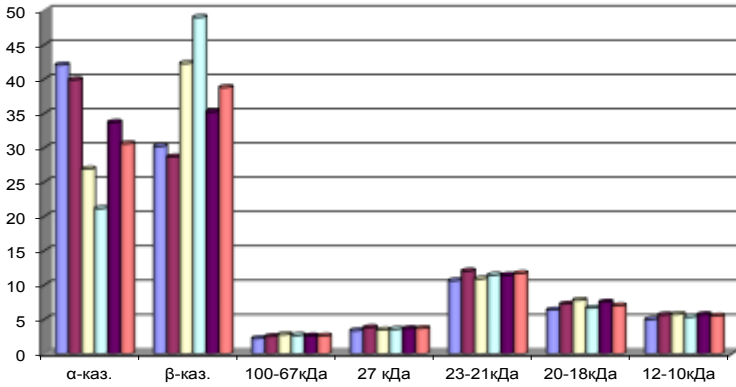


Рисунок – Динаміка вмісту білкових сполук упродовж визрівання бринзи (бринза після пресування): ■ – контроль; ■ – №1 коров.; ■ – №2 овеча; ■ – №3 козина; ■ – №4 коров.:овеч. 1:1; ■ – №5 коров.:коз. 1:1

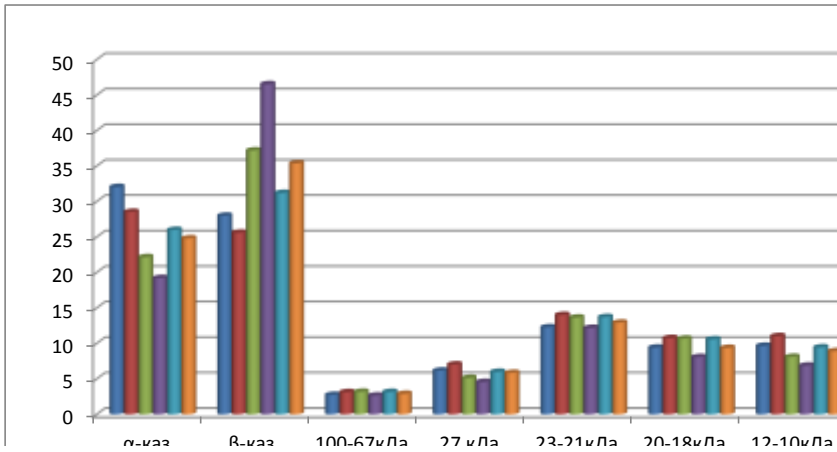


Рисунок 2 – Динаміка вмісту білкових сполук упродовж визрівання бринзи (зріла бринза): ■ – контроль; ■ – №1 коров.; ■ – №2 овеча; ■ – №3 козина; ■ – №4 коров.:овеч. 1:1; ■ – №5 коров.:коз. 1:1

Порівняно до вмісту цієї фракції після пресування в зрілій бринзі залишилося в контрольній бринзі – 91,9%, у дослідній коров'ячій – 89,2%, овечій – 87,9%, козиній – 94,9%, в бринзі

виготовленій із суміші коров'ячого і овечого молока – 88,5%, із суміші коров'ячого і козиного молока – 91,1% ($P < 0,05$). Як видно з наведених даних, за виключенням бринзи з козиного молока, у решти зразків бринзи ступінь розщепленого β -казеїну був приблизно однаковим.

Як і після пресування в зрілій бринзі з коров'ячого молока вміст α -казеїну був меншим у бринзі з овечого молока в 1,37 рази, з козиного в 1,57 рази, в бринзі з суміші коров'ячого й овечого молока в 1,12 рази, коров'ячого і козиного – 1,22 рази. У той же час, в цих видах бринзи було більше β -казеїну відповідно в 1,39; 1,74; 1,17 і 1,32 рази, ніж у коров'ячій бринзі. Слід зауважити, що β -казеїн легко перетравлюється в шлунку людини. У той же час α_{s1} -казеїн є алергеном для людини та може викликати розлади травлення [15].

Подібна тенденція щодо встановленого нами різного ступеня протеолізу α - і β -казеїнів прослідковується низкою авторів під час виготовлення розсольних сирів [16].

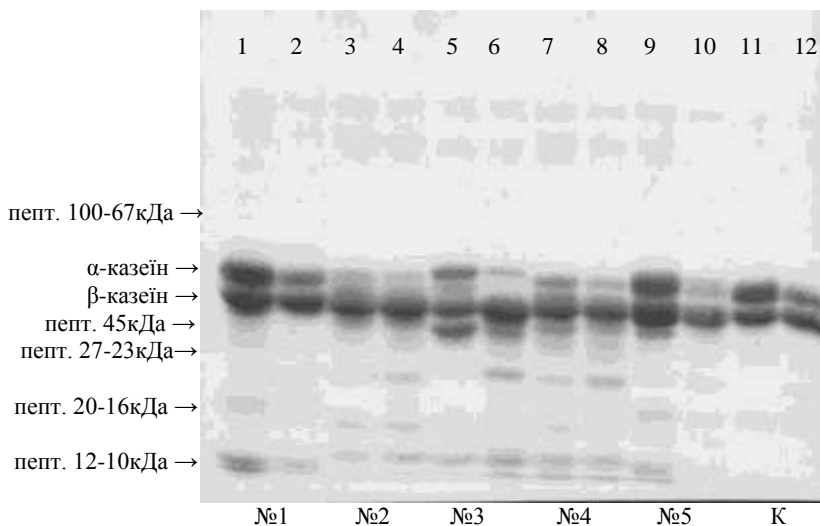


Рисунок 3 – Електрофореграма білків бринзи під час визрівання: 1, 2 – бринза з коров'ячого молока; 3, 4 – бринза, виготовлена з овечого молока; 5, 6 – бринза з козиного молока; 7, 8 – бринза з суміші коров'ячого й овечого молока; 9, 10 – бринза з суміші коров'ячого і козиного молока; 11, 12 – контроль; (1, 3, 5, 7, 9, 11 – бринза після пресування; 2, 4, 6, 8, 10, 12 – зріла бринза)

Розщеплення казеїну супроводжувалось накопиченням в сирній масі пептидів з різною молекулярною масою. Найбільш інтенсивно це відбувалося в бринзі, виготовленій із коров'ячого молока, загальна кількість пептидів у зрілому сирі зростає в 1,45 рази. Дещо менше зростання (1,32 рази) відбувалося в сирі з овечого молока і в половину меншим воно було в сирі з козиного молока (1,15 рази). У бринзі, виготовленій із суміші коров'ячого й овечого та коров'ячого і козиного молока кількість пептидів зростала в 1,38 рази. Такі різниці були зумовлені різною інтенсивністю розщеплення казеїну в цих сирах, і, в першу чергу, α -казеїну.

У всіх досліджуваних зразках бринзи зростання суми пептидів відбувалося за рахунок середньо- і низькомолекулярних фракцій пептидів (27 кДа; 23-21 кДа; 20-18 кДа та 12-10 кДа). Помітніше зростала кількість низькомолекулярних пептидів у бринзі з коров'ячого молока (1,93 рази), менше в бринзі з овечого молока (1,41 рази), а ще менше – у бринзі з козиного молока (1,28 рази). У бринзі, виготовленій з суміші коров'ячого й овечого та коров'ячого і козиного молока, кількість цих пептидів збільшувалась в 1,65 і 1,61 рази. Серед середньомолекулярних пептидів найбільш значно зростали пептиди з молекулярною масою 27 кДа та 20-18 кДа. Незначне зростання спостерігалось відносно пептидів з молекулярною масою 23-21 кДа. Необхідно зазначити, що масштаби накопичення пептидів не спричинили відчуття гіркуватого присмаку [17].

Висновки. 1. Використання під час виготовлення бринзи з коров'ячого, овечого, козиного молока та їх сумішей запропонованого бактеріального препарату та молокозгортального ферменту прискорює процеси протеолізу казеїну в сирній масі, в основному, за рахунок фракції α -казеїну. 2. Найбільш інтенсивно гідроліз α -казеїну відбувався у бринзі з коров'ячого молока, найменше – у бринзі з козиного молока. 3. Порівняно з бринзою, що виготовлена з коров'ячого молока, бринза з овечого і козиного молока містить у 1,52 і 1,94 рази менше α -казеїну та 1,44 і 1,66 рази більше β -казеїну. 4. У зрілій бринзі порівняно з бринзою після пресування відбувалось накопичення середньо- і низькомолекулярних пептидів, яке не спричиняло погіршення смакових якостей сиру.

Список літератури

1. Influence of Starters on Chemical, Biochemical, and Sensory Changes in Turkish White-Brined Cheese During Ripening [Text] / A. A. Haayaloglu [et al.] // Journal of Dairy Science. – 2005. – Vol. 88. – P. 3460–3474.
2. Calvo, M. M. Procesos proteoliticos durante lamaduracion del queso [Text] / M. M. Calvo // Alim. Equip. Technol. – 1990. – Vol. 12. – P. 179–185.

3. Casein breakdown during ripening of Idiazabel cheese: influence of starter and rennet type [Text] / M. S. Vicente [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2000. – Vol. 81. – P. 210–215.

4. Горбатова, К. К. Физико-химические и биохимические основы производства молочных продуктов [Текст] / К. К. Горбатова. – СПб. : ГИОРД, 2004. – 362 с.

5. Andrews, A. T. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins [Text] / A. T. Andrews // *Journal of Dairy Science*. – 1983. – Vol. 50, № 1. – P. 45–55.

6. Fox, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening [Text] / P. F. Fox // *Journal of Dairy Science*. – 1989. – Vol. 72. – P. 1379–1400.

7. Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening [Text] / J. Saldo [et al.] // *International Dairy Journal*. – 2002. – Vol. 12, № 1. – P. 35–44.

8. Proteolysis in cheese during ripening [Text] / V. K. Upadhyay [et al.] // *Cheese : Chemistry, physics and microbiology* / P. F. Fox [et al.]. – 3 ed. – Amsterdam, 2004. – P. 391–433.

9. Tzanetakis, N. The quality of white-brined cheese from goat's milk made with different starters [Text] / N. Tzanetakis, A. Vafopoulou-Mastrojannaki, E. Litopoulou-Tzanetakis // *Food Microbiol.* – 1995. – Vol. 12. – P. 55–63.

10. Кузнецов, В. В. Сыры. Справочник технолога молочного производства. Технология и рецептуры [Текст] / В. В. Кузнецов, Г. Г. Шилер ; под общ. ред. Г. Г. Шилера. – СПб. : ГИОРД, 2005. – 512 с.

11. Effect of various starters on the quality of cheese in brine [Text] / C. Kehagias [et al.] // *Food Microbiol.* – 1995. – Vol. 12. – P. 413–419.

12. Veinoglou, B. C. The effect of starters on the production of Teleme cheese [Text] / B. C. Veinoglou, E. S. Boyazoglou, E. D. Kotouza // *Int. Dairy Ind.* – 1980. – Vol. 45. – P. 11–19.

13. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [Text] // *Nature*. – 1970 – Vol. 227. – P. 680–685.

14. Casein breakdown during ripening of Idiazabel cheese : influence of starter and rennet type [Text] / M. S. Vicente [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2000. – Vol. 81. – P. 210–215.

15. Козье молоко – натуральная формула здоровья [Текст] / Т. Л. Остроумова. [и др.] // *Молочная промышленность*. – 2005. – № 8. – С. 69–80.

16. Influence of starter cultures on the proteolysis of Teleme cheese made from different types of milk [Text] / E. C. Pappa [et al.] // *Lait*. – 2006. – Vol. 86. – P. 273–290.

17. Горбачова, К. К. Биохимия молока и молочных продуктов [Текст] / К. К. Горбатова. – М. : Легкая и пищевая пром-сть, 1984. – 344 с.

Отримано 1.10.2010. ХДУХТ, Харків.

© Б.І. Галух, Г.В. Дроник, 2010.