

УДК 637.127.3

*Тийу-Май ЛАХТ, Райво ВИЛУ*

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГИДРОЛИЗА КАЗЕИНА В СОЗРЕВАЮЩЕМ ЭММЕНТАЛЬСКОМ СЫРЕ

Эмментальский сыр является крупным сычужным сыром с высокой температурой второго нагревания. Наименьший срок созревания этого сыра составляет 3 месяца, с применением же классической технологии 9 месяцев. Длительный период созревания, а также сложная многовидовая закваска усложняют приготовление эмментальского сыра и предъявляют качеству используемого молока повышенные требования. Поскольку протеолиз казеинового комплекса в сырной массе протекает под действием протеаз из многих источников (коагулянт, закваска, чужеродные бактерии), целесообразно изучать его во время процесса производства, а не в искусственных условиях (например, с выделенными ферментами и с казеином в качестве субстрата). Как известно (De Jong, 1977), изменяющаяся консистенция сырной массы прямо зависит от скорости и глубины гидролиза основных фракций казеина. Электрофорез в ПААГ позволяет разделить компоненты казеинового комплекса сыра и таким образом следить за гидролизом сырного белка.

В настоящей работе процесс гидролиза казеинового комплекса во время выработки эмментальского сыра в промышленных условиях изучен с помощью электрофореза в ПААГ.

### Материал и методика

Эмментальский сыр приготовляли в производственных условиях на Пайдеском КМП ЭССР. Образцы для анализов брали на различных этапах выработки сыра:

1. Пастеризованное молоко
2. Зрелое молоко
3. Смесь до внесения сычужного фермента
4. Зерно до нагревания
5. Зерно после нагревания
6. Сыр после прессования
7. Сыр после посолки
8. Сыр после выдержки в первой холодной камере
9. Сыр после выдержки в бродильной камере
10. Готовый сыр

Электрофоретический анализ белков проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) по методике, описанной в литературе (Chaplin, Green, 1980).

1 г сыра разрезали на мелкие кусочки и гомогенизировали в 25 мл трис-НСI буфера, содержащем 6,6 М мочевины, рН 6,7. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин. После центрифугирования жир отделяли, добавляли 80%-ный раствор сахарозы (1/4 от емкости) и капельку раствора бромфенолсинего, который служил маркером при электрофорезе. Разделение белковых фракций проводили при помощи комплекта для вертикального электрофореза в трубках (венгерского производства). Обычно на одну трубку наносили 50 мкл пробы. Разделение белков проводили при постоянном токе 2 мА на трубку при ком-

натной температуре, длительность этого процесса составляла около 4 ч. Гели окрашивали раствором Кумасси G-250 (Blakesly, Boezi, 1977) в течение ночи, промывали водой и денситометрировали на «ЛКВ Ult-gascan» (Швеция).

### Результаты и обсуждение

Белковые фракции в геле можно охарактеризовать следующим образом (Gallmann, 1982): 1) фракции с подвижностью меньше, чем у  $\beta$ -казеина — продукты протеолиза  $\beta$ -казеина (в основном  $\gamma$ -казеины); 2) фракции между  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеином — продукты протеолиза  $\alpha_s$ -казеина; 3) фракции с подвижностью больше, чем у  $\alpha_s$ -казеина — продукты протеолитического распада  $\alpha_s$ -казеина (рис. 1). Содержание в образцах различных фракций определяли по измерению на денситограммах высоты пиков. Для калибровки пиков использовали стандартный казеиновый комплекс, осажденный из молока по известной методике (Kirchmeyer, Breit, 1983). Ход гидролиза  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеина в процессе выработки сыра определяли по методике Виссера и др. (Visser, de Groot-Mostert, 1977). Пример расчетов графически изображен на рис. 2. В данной выработке эмментальского сыра гидролиз  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеина проходит на первых этапах приготвления и созревания быстрее, чем на последующих этапах. После прессования сохраняется примерно 80% от нативного казеина, входящего в состав зерна. Со временем протеолиз белков замедляется, готовый сыр 3-месячного возраста данной выработки содержит еще 47% негидролизованного  $\beta$ -казеина и 37%  $\alpha_s$ -казеина. Согласно классической схеме производства (Langsrud, Reinbold, 1973), скорость гидролиза белка эмментальского сыра должна быть наибольшей в бродильной камере: расщепление белка протекает параллельно образованию

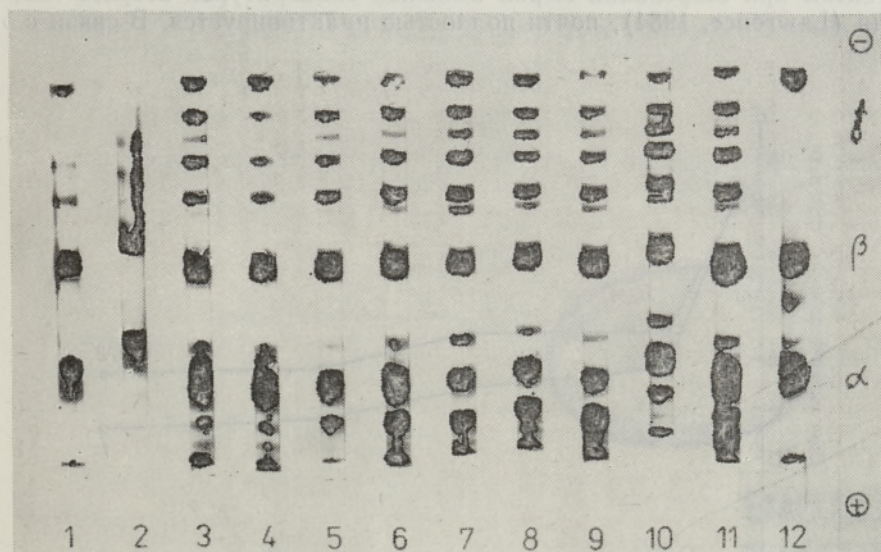


Рис. 1. Разделение казеинового комплекса в ПААГ во время изготовления эмментальского сыра. 1—9 — 1-я выработка 17.04.84; 10, 11 — 2-я выработка 21.02.84. 1 — зерно до нагревания; 2 — зерно после нагревания; 3 — сыр после прессования; 4 — сыр после посолки; 5 — 10-дневная выдержка в первой холодной камере; 6 — сыр 1-й выработки после первой холодной камеры; 7 — готовый сыр 1-й выработки; 8 — готовый сыр 2-й выработки; 9 — готовый сыр 3-й выработки; 10 — сыр 2-й выработки после первой холодной камеры; 11 — сыр в первой холодной камере; 12 — казеин, осажденный из молока, 2,5 мг/мл.

рисунка, быстрый гидролиз в холодных помещениях может содействовать образованию неправильной консистенции сырной массы, которая в свою очередь приводит к образованию трещин и неправильного рисунка (слепой сыр).

Исследование гидролиза казеиновых фракций в опытных выработках эмментального сыра в апреле 1986 г. на экспериментальном участке КТБ Эстонского Агропрома в г. Тюри показывает, что скорость гидролиза  $\alpha_s$ - и  $\beta$ -казеина практически одинакова на всех этапах созревания. Скорость гидролиза низкая в бродильной камере (при 22 °С), но заметно повышается в последней холодной камере (при 7 °С). Сравнение протеолиза показывает, что расщепление казеина протекает в производственных варках эмментальского сыра быстрее, чем в опытных (рис. 3).

Вышеприведенные данные следует признать в некотором смысле типичными для выработок эмментальских сыров весеннего периода, как в производственных условиях, так и в опытных. Следует обратить внимание на различия в протекании гидролиза казеина в опытных и производственных выработках сыра, так как процессы в малых объемах могут происходить иначе, чем в масштабных.

Выработка сыра представляет из себя процесс выделения воды из казеинового сгустка при помощи вводимого в молоко сычужного фермента. В коровьем молоке содержится в среднем 3,2% белка, из которого 80% является казеином. Казеин, как известно, не единый белок, а комплекс различных белков, причем  $\alpha_s$ -казеин составляет до 66% от общего казеина,  $\beta$ -казеин — 29% и  $\gamma$ -казеин (продукт протеолитического распада  $\beta$ -казеина) — 5% (Scott, 1979). Если учесть, что примерно 90% (Antila и др., 1980) из казеина молока входит в сгусток, то содержание казеина в сыре может достигать 220 мг/г.

Гидролиз казеина в сыре проходит под воздействием различных протеаз. Во время второго нагревания эмментальского сыра (при 50—54 °С) химозин, который является наиболее важным протеолитическим агентом при созревании сыров с низкой температурой второго нагревания (Lawrence, 1984), почти полностью инактивируется. В связи с этим

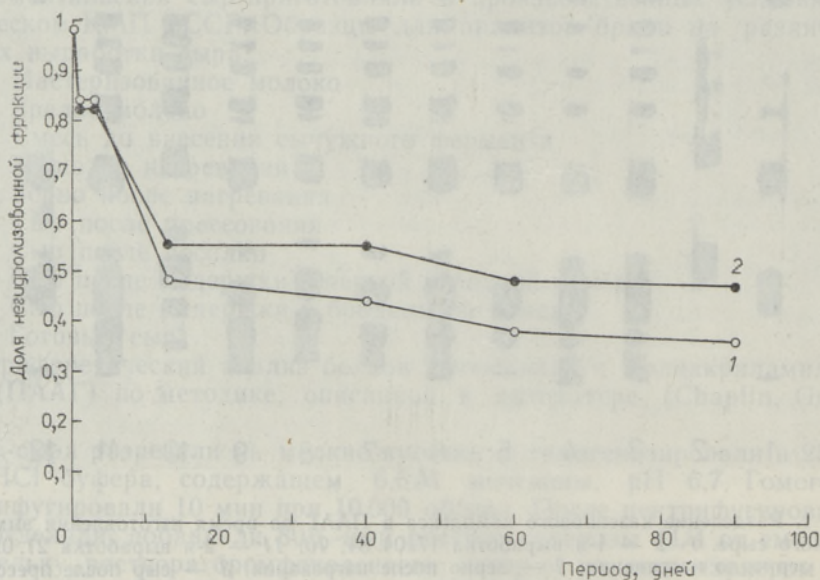


Рис. 2. Гидролиз  $\alpha_s$ - (1) и  $\beta$ -казеина (2) эмментальского сыра во время созревания на Пайдеском КМП. 1-я выработка 17.04.84. На оси абсцисс — дни с начала выработки, на оси ординат — относительное содержание негидролизованного белка.

заквасочные бактерии и молоко являются основными источниками протеолитических ферментов во время выработки эментальского сыра.

Из молока выделено две сериновые протеиназы. Эти ферменты являются основными нативными протеиназами коровьего молока, куда попадают из крови (Reimerdes, 1983). Эти протеиназы расщепляют  $\beta$ -казеин в 2—3 раза быстрее, чем  $\alpha_s$ -казеин. При 5°C их активность составляет около 20% активности, достижимой при 37°C (Reimerdes, 1983). Из молока выделена также кислая протеиназа, специфичность которой по отношению к основным фракциям казеина подобна специфичности сычужного фермента (Шидловская, 1985). При повышенном содержании соматических клеток протеолитическая активность молока сильно возрастает. Протеолитические ферменты молока довольно устойчивы по отношению к тепловой обработке, они не инактивируются при обычно используемых режимах пастеризации молока, более того, их активность даже повышается во время пастеризации за счет инактивации нативных термолабильных ингибиторов (Шидловская, 1985).

В состав закваски эментальского сыра обычно входят термофильные стрептококки *Str. thermophilus* и термофильные молочнокислые палочки *Lactobacillus helveticus* (соответственно 0,4 и 0,05% от количества молока). Пайдеский КМП ЭССР получает термофильную закваску (под названием ТМБ) в готовом виде из Барнаульского филиала ВНИИМС. Добавляемая ТМБ составляет 0,4% от количества молока. Перед выработкой сыра в молоко добавляют 0,2% мезофильной закваски и выдерживают в течение ночи. В процессе приготовления сыра в котел добавляют дополнительно 1,2% мезофильной закваски. Общее число молочнокислых бактерий в котле составляет обычно  $10^6$  бакт./мл, после прессования сыра  $10^9$  бакт./мл. Заквасочные бактерии почти не имеют экзопротеаз, содержащиеся в них внутриклеточные или мембранносвязанные протеазы, которые освобождаются при автолизе клеток, гидролизуют  $\alpha_s$ -казеин быстрее, чем  $\beta$ -казеин (Ohmiya, Sato, 1970).

Учитывая факт, что гидролиз казеина в пайдеском сыре начинается уже во время прессования, в нем могут участвовать главным образом

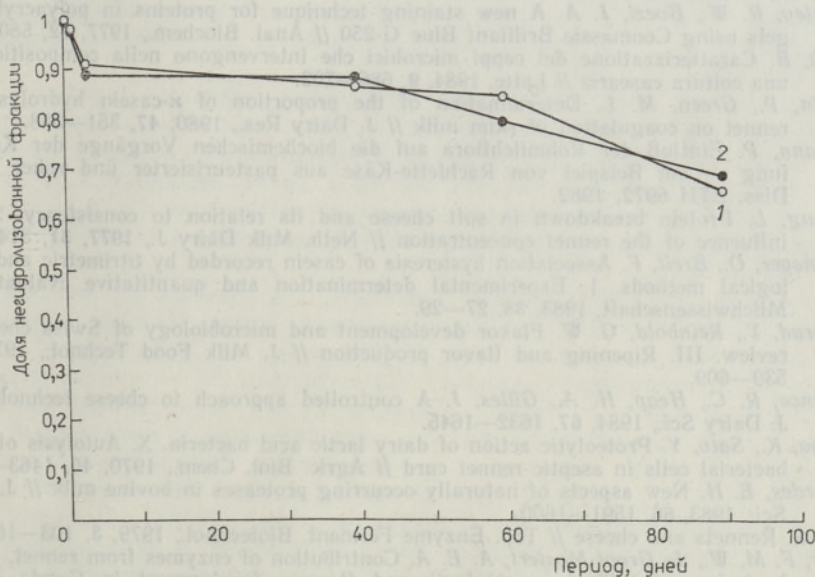


Рис. 3. Гидролиз  $\alpha_s$ - (1) и  $\beta$ -казеина (2) в эментальском сыре во время созревания. Средние данные опытных выработок в апреле 1986 г. в Тюри. На оси абсцисс—дни с начала выработки, на оси ординат — относительное содержание негидролизованного белка.

протеазы молока и чужеродных бактерий, поскольку протеазы заквасочных бактерий освобождаются лишь постепенно при их автолизе на более поздних стадиях созревания сырной массы. Используемое молоко содержит в среднем от 500 тыс. до 1 млн. соматических клеток в миллилитре молока. Обсемененность (зараженность) молока чужеродными бактериями также довольно высокая. Этим можно объяснить как сравнительно быстрый гидролиз  $\beta$ -казеина на первых этапах выработки, так и повышенное содержание продуктов расщепления  $\beta$ -казеина в готовом сыре по сравнению с эментальскими сырами других производств. Следует отметить, что содержание продуктов расщепления  $\beta$ -казеина в готовом эментальском сыре финского производства значительно меньше, чем в пайдеском сыре.

Содержание нативного казеина в готовом эментальском сыре по данным Б. Бланка (Blanc, 1984) составляет примерно 65% от его начального содержания. Консистенция сыра прямо зависит от глубины гидролиза  $\alpha_s$ -казеина — главного компонента белкового комплекса сырной массы (De Jong, 1977). Содержание основных компонентов казеинового комплекса в готовом пайдеском сыре значительно не отличается от соответствующих значений, приведенных в литературе ( $\alpha_s$ -казеина примерно 50%,  $\beta$ -казеина примерно 65% от начального), но интенсивность протеолиза в бродильной камере по сравнению с другими этапами выработки сыра незначительна. Несвоевременность протеолиза может быть одной причиной главного порока пайдеского сыра — образования трещин в сырной массе. Различно протекающий протеолиз казеина в опытных и серийных варках при использовании одних и тех же заквасок и молока обусловлены, по всей вероятности, особенностями технологического режима на первых этапах выработки сыра,

#### ЛИТЕРАТУРА

- Шидловская В. П. Ферменты молока. М., 1985, 49—50.
- Antila, V., Antila, M., Antila, P. Juustonvalmistus. Helsinki, 1979, 33—96.
- Blakesley, R. W., Boezi, J. A. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G-250 // *Anal. Biochem.*, 1977, 82, 580—582.
- Blanc, B. Caratterizzazione dei ceppi microbici che intervengono nella composizione di una coltura casearia // *Latte*, 1984, 9, 686—702.
- Chaplin, P., Green, M. L. Determination of the proportion of  $\alpha$ -casein hydrolysed by rennet on coagulation of skim milk // *J. Dairy Res.*, 1980, 47, 351—358.
- Gallmann, P. Einfluß der Rohmilchflora auf die biochemischen Vorgänge der Käse- reifung — am Beispiel von Rachtlette-Käse aus pasteurisierter und roher Milch. Diss. ETH 6972, 1982.
- De Jong, L. Protein breakdown in soft cheese and its relation to consistency. 2. The influence of the rennet concentration // *Neth. Milk Dairy J.*, 1977, 31, 314—327.
- Kirchmeyer, O., Breit, F. Association hysteresis of casein recorded by titrimetric and rheological methods. 1. Experimental determination and quantitative evaluation // *Milchwissenschaft*, 1983, 38, 27—29.
- Langsrud, T., Reinbold, G. W. Flavor development and microbiology of Swiss cheese. A review. III. Ripening and flavor production // *J. Milk Food Technol.*, 1973, 36, 539—609.
- Lawrence, R. C., Heap, H. A., Gilles, J. A controlled approach to cheese technology // *J. Dairy Sci.*, 1984, 67, 1632—1645.
- Ohmiya, K., Sato, Y. Proteolytic action of dairy lactic acid bacteria. X. Autolysis of lactic bacterial cells in aseptic rennet curd // *Agric. Biol. Chem.*, 1970, 40, 1463—1469.
- Reimerdes, E. H. New aspects of naturally occurring proteases in bovine milk // *J. Dairy Sci.*, 1983, 66, 1591—1600.
- Scott, R. Rennets and cheese // *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.*, 1979, 3, 103—169.
- Visser, F. M. W., de Groot-Mostert, A. E. A. Contribution of enzymes from rennet, starter bacteria and milk to proteolysis and flavour development in Gonda cheese. 4. Protein breakdown: a gel electrophoretic study // *Neth. Milk Dairy J.*, 1977, 31, 247—264.

### KASEIINI HÜDROLÜÜS VALMIVAS EMMENTALI JUUSTUS

Kaseiini hüdroolüüsi jälgimiseks emmentali juustu valmistamisel kasutati elektroforeesi polüakrüülamiidgeelis (PAAE). Kõvadele laabijuustudele on üldiselt iseloomulik nn. « $\alpha$ -küpsemine», s. t.  $\alpha_s$ -kaseiini hüdroolüüsi kiirus on oluliselt suurem  $\beta$ -kaseiini hüdroolüüsi kiirusest. Paide PTK-s valmistatud juustudes oli  $\alpha_s$ - ja  $\beta$ -kaseiini hüdroolüüsi kiirus praktiliselt ükssama. Sellist valgu hüdroolüüsi võib põhjustada piima saastatus võermikroflooraga (eriti *Bacillus*tega) ja suur soomaatiliste rakkude sisaldus lähtepiimas.

Tiiu-Mai LAHT, Raivo VILU

### HYDROLYSIS OF CASEIN IN RIPENING EMMENTALER CHEESE

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAAE) was used to study the breakdown of  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein in ripening Emmentaler cheese. Hard cheeses have mainly an «alfa-ripening», i.e. the rate of hydrolysis of  $\alpha_s$ -casein is higher than the rate of hydrolysis of  $\beta$ -casein, but in cheeses made in Paide the rate of  $\alpha_s$ - and  $\beta$ -casein was mostly the same. This fact may be explained by high levels of non-starter bacteria and somatic cells in the milk, used for the production of cheese.