

<https://doi.org/10.21603/2073-4018-2025-1-13>

УДК 637.3

Оригинальная статья

О протеолизе в полутвердых сырах с участием пропионовокислых бактерий*

Ольга Валентиновна Лепилкина, д-р техн. наук, главный научный сотрудник

E-mail: ov.lepilkina@fncps.ru

Татьяна Сергеевна Смирнова, младший научный сотрудник

E-mail: t.smirnova@fncps.ru,

Анастасия Игоревна Григорьева, младший научный сотрудник

E-mail: a.grigoriyeva@fncps.ru,

Григорий Новомирович Рогов, канд. техн. наук, директор

E-mail: g.rogov@fncps.ru

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия – филиал
Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова, г. Углич

Целью работы было установление возможности регулирования процесса газообразования в сырах с низкой температурой второго нагревания, созревающих с участием пропионовокислых бактерий, путем использования молокосвертывающих ферментов с различной протеолитической активностью. Актуальность проводимых исследований обусловлена риском получения сыров с недостаточно развитым рисунком, что связано с медленным развитием пропионовокислых бактерий и, как следствие, пониженным газообразованием. Для активизации роста пропионовокислых бактерий предложено усилить протеолиз на первой стадии созревания сыра с целью обеспечения пропионовокислых бактерий питательным субстратом в достаточном количестве. Для решения поставленной задачи проведены сравнительные исследования процесса созревания с участием пропионовокислых бактерий *Propionibacterium freudenreichii* полутвердых сыров с низкой температурой второго нагревания, изготовленных с молокосвертывающими ферментами с высокой (600 ИМСУ/мл) и низкой (100 ИМСУ/мл) протеолитической активностью. Процесс созревания оценивали по степени протеолиза методом Кьельдаля и пептидным профилям, полученным методом гель-фильтрации высокого разрешения на приборе АКТА pure 25 (Швеция). Определение количества выявленных пептидов в водорастворимой фракции сыров проводили по полученным хроматограммам, измеряя площади пиков, соответствующих пептидам с разной молекулярной массой. Установлена тесная связь между развитием пропионовокислых бактерий и количеством продуктов протеолиза в сыре, которое зависит от протеолитической активности молокосвертывающего фермента. Использование молокосвертывающих ферментов с высокой протеолитической активностью приводит к накоплению большого количества пептидов, что способствует увеличению популяции пропионовокислых бактерий *P. freudenreichii*, интенсификации газообразования и, как следствие, формированию более развитого рисунка сыра. Рекомендовано учитывать соотношение протеолитических активностей используемых ферментных препаратов и основной заквасочной микрофлоры с целью регулирования процесса газообразования в сырах, созревающих с участием пропионовокислых бактерий.

Ключевые слова: сыр, пропионовокислые бактерии, протеолиз, пептидный профиль, газообразование, рисунок сыра

Для цитирования: О протеолизе в полутвердых сырах с участием пропионовокислых бактерий / О. В. Лепилкина, Т. С. Смирнова, А. И. Григорьева, Г. Н. Рогов // Сыроделие и маслоделие. 2025. № 1. С. 34–41. <https://doi.org/10.21603/2073-4018-2025-1-13>

*Исследования выполнены за счет гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации на проведение крупных научных проектов по приоритетным направлениям научно-технологического развития (проект № 075-15-2024-483).

Введение

Аналитики сырного рынка отмечают растущую популярность сыров с пропионовокислыми бактериями. К ним относятся виды *Propionibacterium freudenreichii*, *Acidipropionibacterium thoenii*, *A. jensenii* и *A. acidipropionici*, среди которых *P. freudenreichii* чаще всего используется при производстве сыров [1].

Общее название твердых сыров, изготавливаемых с пропионовокислыми бактериями, часто обозначают общим термином «швейцарские сыры». Это связано с родиной наиболее известного твердого сыра Эмменталь, первые упоминания которого относятся к 12 веку [2].

Наряду с твердыми сырами в мировой практике сыроделия получили распространение полутвердые сыры, изготавливаемые с заквасками, в состав которых входят пропионовокислые бактерии в сочетании с молочнокислыми. К ним относятся Jarlsberg (Норвегия), Maasdam (Нидерланды), Samsøe (Дания), Alpsberg и Felsberg (Германия) и Grevé (Швеция). Технология производства этих сыров объединяет технологии производства сыров типа Гауда (Gouda) и Эмменталь (Emmental), поэтому их называют «Goutaler» – термином, объединяющим названия этих сыров [2].

Для сыров как швейцарского типа, так и типа «Goutaler» характерным признаком является особый сладковато-пряный вкус с ореховыми нотами. Особый вкус этих сыров формируется благодаря активному пропионовокислому брожению, в результате которого накапливается комплекс вкусоароматических веществ, представленных в основном органическими кислотами: уксусной, пропионовой, янтарной, молочной, глутаминовой, а также летучими веществами (ацетонин, диацетил, диметилсульфид, ацетальдегид), участвующими в формировании аромата сыра [3, 4].

При производстве этих сыров происходят два последовательных ферментативных процесса. Сначала молочнокислые бактерии преобразуют лактозу в лактат, а затем во время созревания пропионовокислые бактерии преобразуют лактат в пропионовую кислоту, уксусную кислоту и углекислый газ. Пропионовая кислота

приводит к типичному ореховому привкусу сыра, а углекислый газ отвечает за образование крупных глазков¹, наличие которых является важнейшим показателем качества сыров этого вида.

Процесс образования углекислого газа, а следовательно, глазков при созревании сыров возможен при условии активного развития пропионовокислых бактерий. Для этого необходимо наличие в сыре достаточного количества пептидов и свободных аминокислот², являющихся для них питательным субстратом. В твердых сырах с длительными сроками созревания низкомолекулярные пептиды и аминокислоты образуются естественным путем за счет длительности процессов протеолиза. При этом термофильные молочнокислые бактерии, в частности *Lactobacillus helveticus*, стимулируют развитие пропионовокислых бактерий. Это происходит вследствие того, что *Lb. helveticus* лизируются на ранней стадии созревания и их цитоплазматические ферменты, в том числе пептидазы, высвобождаются в сырную матрицу. Под действием пептидаз происходит протеолиз с образованием пептидов и свободных аминокислот, которые способствуют росту популяции пропионовокислых бактерий и, следовательно, активизации процесса газообразования. Таким образом, в твердых сырах процесс образования глазков во время длительного созревания во многом зависит от протеолитической активности лактобацилл [1].

По сравнению с твердыми сырами, которые созревают в течение 6 месяцев и более, продолжительность созревания полутвердых сыров меньше. Так, например, Maasdam готов к употреблению через 4 недели созревания [1, 2]. Из-за этого, а также из-за отсутствия в составе заквасочной микробиоты штаммов с высокой протеолитической активностью существует риск получения полутвердых сыров с недостаточно развитым рисунком. Это связано с медленным развитием пропионовокислых бактерий и, как следствие, пониженным газообразованием. В данном случае представляется целесообразным пойти по пути усиления протеолиза на первой стадии созревания сыра с целью обеспечения пропионовокислых бактерий питательным субстратом в достаточном количестве.

¹Condon, S. Stimulation of Propionic Acid Bacteria by Lactic Acid Bacteria in Cheese. End of Project Report / S. Condon [et al.]. – Teagasc, 2001. – 15 p.

²Там же.



Источник изображения: freepik.com

Одним из путей решения этой задачи может быть использование молокосвертывающих ферментных препаратов с повышенной протеолитической активностью, следствием действия которых будет первичный протеолиз, что создаст благоприятные условия для развития пропионовокислых бактерий, нуждающихся в достаточном количестве питательного субстрата.

В результате повышения скорости протеолиза в сыре следует ожидать не только интенсификации процесса газообразования, но и сокращения времени нахождения продукта в теплой камере, что позволит существенно снизить риск возможного развития маслянокислых бактерий, а значит уменьшить их негативное влияние на качество продукта.

Вместе с тем следует отметить, что при использовании пропионовокислых бактерий в созревании сыров вреден как их недостаток, так и избыток. Низкий уровень развития пропионовокислых бактерий является причиной формирования таких пороков, как невыраженный вкус и запах, мелкий рисунок или его отсутствие [4]. Избыток этих микроорганизмов может спровоцировать образование большого количества углекислого газа, что может привести в начале созревания к образованию трещин, если эластичность сырного тела недостаточна, а в конце созревания – к образованием больших глазков и трещин или расколов [2].

Исходя из вышеизложенного, целью работы было установление возможности регулирования процесса газообразования в сырах с низкой температурой второго нагревания, созревающих с участием пропионовокислых бактерий, путем использования молокосвертывающих ферментов с различной протеолитической активностью.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования были полутвердые сыры с массовой долей жира в сухом веществе (45 ± 1 %), изготовленные в сыродельном цехе Всероссийского научно-исследовательского института маслоделия и сыроделия. Этапы изготовления экспериментальных сыров:

- пастеризация и охлаждение молочной смеси до температуры (32 ± 1) °С;
- внесение бактериальной закваски, состоящей из мезофильных молочнокислых микроорганизмов: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* – (30 ± 1) %, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* – (50 ± 1) %, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* – (20 ± 1) % с общим количеством 1×10^{12} жизнеспособных клеток на 300 кг молочной смеси;
- внесение культуры пропионовокислых бактерий вида *Propionibacterium freudenreichii* в количестве 3×10^9 жизнеспособных клеток на 300 кг молочной смеси;
- внесение молокосвертывающего фермента:
- образование и разрезка сгустка;
- постановка сырного зерна;
- формование и прессование сырного зерна;
- созревание головок сыра.

Перед внесением молокосвертывающего фермента молочную смесь делили на две равные части. В одну часть вносили молокосвертывающий ферментный препарат *Chy-max Extra 600* (Chr. Hansen, Дания) с протеолитической активностью 600 IMCU/мл, в другую – ферментный препарат *Chy-max Supreme 100* (Chr. Hansen, Дания) с протеолитической активностью 100 IMCU/мл.

Полученные после прессования головки сыра массой от 6,3 до 7,0 кг упаковывали в термоусадочные пакеты с газопроницаемой способностью по CO_2

1750 см³/м²/24 ч. и направляли на созревание сначала в камеру с температурой (10±1) °С на 10 суток, затем – в «теплую» камеру с температурой (24 ± 1) °С на 15 сут, после чего – вновь в камеру с температурой (10 ± 1) °С на 10 суток.

В процессе созревания сыров через 10, 25 и 35 суток определяли массовую долю общего (по ГОСТ Р 54662-2012) и водорастворимого (по пат. № 2689755 «Способ выделения водорастворимых белков из сыра») белка методом Кьельдаля. По отношению массовой доли водорастворимого белка к общему белку оценивали степень протеолиза (в %).

В водорастворимой фракции сыров определяли пептидные профили методом гельфильтрации высокого разрешения на приборе АКТА pure 25 (Швеция) с использованием хроматографической колонки Superose 6 Increase 10/300 GL (Cytiva, Швеция) с диапазоном разделяемых масс от 1 кДа до 5000 кДа. Элюент – водный раствор 0,05M Na₂HPO₄ + 0,15M NaCl, скорость подачи элюента – 0,5 мл/мин; длина волны детектора – 280 нм.

Определение количества выявленных пептидов в водорастворимой фракции сыров проводили по полученным хроматограммам, измеряя площади пиков, соответствующих пептидам с разной молекулярной массой. Площади пиков выражали в условных единицах min × mAu, представляющих собой произведение единиц времени (мин, ось X) на единицы оптического поглощения (mAu, ось Y).

Для удобства сравнения все выявленные пептиды были разделены по молекулярным массам на четыре группы (см. табл.).

Для определения количества пропионовокислых бактерий в сырах использовали плотную питательную среду, приготовленную следующим образом: в 1 дм³ воды вносили 30 г пептона,

1 г дрожжевого автолизата, 10 г агара. После растворения агара в среду добавляли 20 см³ раствора молочной кислоты концентрацией 40 %. Доводили активную кислотность среды до pH = 7,1 ± 0,1, добавляя раствор гидроксида натрия концентрацией 20 %. Инкубацию посевов проводили при температуре (30 ± 1) °С в течение 7 суток. При подсчете колоний учитывались только типичные для пропионовокислых бактерий – в виде крупных «дисков» или «гречишных зерен» светло-кремового цвета. Подтверждение принадлежности образовавшихся типичных колоний к пропионовокислым бактериям проводили методом микроскопирования по ГОСТ 32901-2014.

Визуализацию и статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel-2010.

Источник изображения: freepik.com



Таблица. Фракции пептидов

| Молекулярная масса, кДа | Фракции |
|-------------------------|--|
| 40-200 | Низкомолекулярные белки, полипептиды |
| 10-40 | Полипептиды и высокомолекулярные пептиды |
| 1-10 | Среднемолекулярные пептиды |
| менее 1 | Низкомолекулярные пептиды и свободные аминокислоты |

Результаты и их обсуждение

На рисунке 1 представлены результаты изменения степени протеолиза при созревании экспериментальных сыров, изготовленных с применением молокосвертывающих ферментных препаратов, обладающих высокой (Chy-max Extra 600) и низкой (Chy-max Suprime 100) протеолитической активностью.

Полученные результаты были ожидаемы и подтвердили более активное протекание протеолиза в сырах, при изготовлении которых для свертывания молочной смеси использовался фермент-

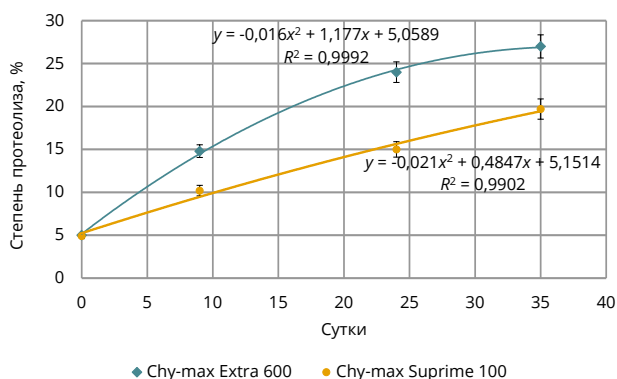
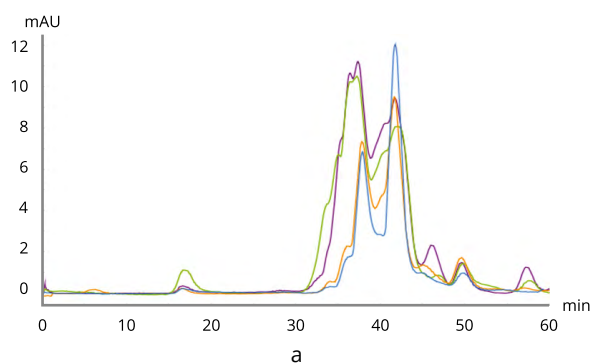


Рисунок 1. Зависимость протеолиза от протеолитической активности молокосвертывающего фермента



ный препарат Chy-max Extra 600 с более высокой протеолитической активностью (600 IMCU/мл). К концу созревания после истечения 35 суток в этих сырах степень протеолиза была на уровне 27 %, в то время как в сырах, изготовленных с ферментным препаратом Chy-max Suprime 100 с протеолитической активностью 100 IMCU/мл – на уровне 20 %.

В процессе протеолиза в сырах образуются пептиды с разной молекулярной массой, а также (на последней стадии) свободные аминокислоты. Сравнение пептидных профилей экспериментальных сыров (рис. 2) показало различие, выражающееся в высоте пиков, представленных на хроматограммах.

При визуальной близости по форме пептидный профиль сыра, изготовленного с ферментным препаратом Chy-max Extra 600, показал более высокие пики, что свидетельствует о количественном преобладании продуктов протеолиза в этом сыре. Это согласуется и подтверждает результаты, представленные на рисунке 1.

Анализ количественного распределения групп пептидов с разной молекулярной массой в разные сроки созревания сыров представлен на рисунке 3.

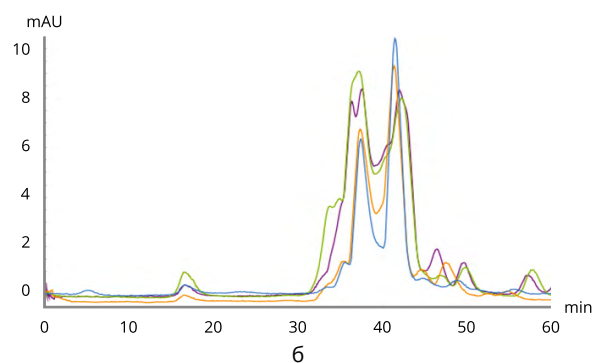


Рисунок 2. Пептидные профили исследованных сыров. а) Chy-max Extra 600; б) Chy-max Suprime 100

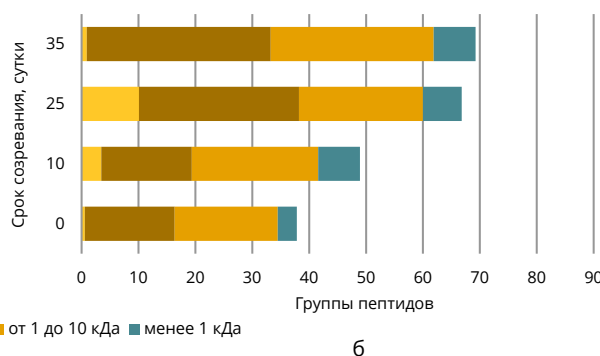
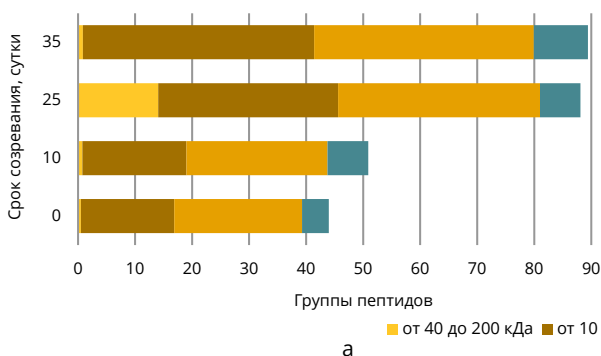


Рисунок 3. Количественное распределение продуктов протеолиза с разной молекулярной массой в разные сроки созревания сыров: а) Chy-max Extra 600; б) Chy-max Suprime 100

Из полученных данных следует, что в процессе созревания в обоих сырах происходит увеличение количества высокомолекулярных (от 10 до 40 кДа), средне- (от 1 до 10 кДа) и низкомолекулярных (менее 1 кДа) пептидов. В начале созревания (0 суток) в составе продуктов протеолиза преобладали высокомолекулярные и среднемолекулярные пептиды, количество которых увеличивалось в процессе созревания. В сыре, изготовленном с использованием молокосвертывающего фермента Chu-max Extra 600, накопление этих фракций пептидов проходило в большей степени.

Количество пептидов и аминокислот с молекулярными массами менее 1 кДа, по которому судят о глубине протеолиза, незначительно отличалось между сырами с тенденцией к увеличению к концу созревания в сыре, изготовленном с молокосвертывающим ферментом Chu-max Extra 600.

Оценивая в целом пептидные профили исследованных сыров, можно сделать вывод, что в основном они представлены пептидами в диа-

пазоне молекулярных масс от 1 до 40 кДа. Общее количество продуктов протеолиза в конце созревания в сыре, изготовленном с использованием молокосвертывающего ферментного препарата Chu-max Extra 600 с более высокой протеолитической активностью, было больше (89,5 min × mAu), чем в сыре, изготовленном с молокосвертывающим ферментом Chu-max Suprime 100 (76,8 min × mAu), что было ожидаемо.

Примечательно, что на 25 сутки созревания в обоих сырах отмечен максимум количества полипептидов с молекулярной массой от 40 до 200 кДа. К 35 суткам наблюдалось их существенное снижение вследствие протеолиза. Вследствие этого пополнялась группа высокомолекулярных пептидов, которые в свою очередь «перетекали» в группу среднемолекулярных. Наблюдаемый максимум высокомолекулярной фракции в 25 суток созревания, очевидно, является результатом первичного протеолиза казеиновых белков, обусловленного протеолитическим действием молокосвертывающего фермента. После этого срока

Источник изображения: freepik.com



главную роль начинают играть протеолитические ферменты микроорганизмов закваски, которые вызывают вторичный протеолиз. Данное наблюдение подтверждается активным развитием пропионовокислых бактерий в период нахождения сыра в «теплой» камере – рисунок 4.

Наблюдение за развитием пропионовокислых бактерий показало, что их уровень в обоих сырах практически не изменялся пока сыр находился в камере предварительного созревания при температуре 10 °С, оставаясь на уровне $(3,6 \pm 0,6) \times 10^5$ КОЕ/г, что соответствует имеющимся знаниям о минимальной температуре развития пропионовокислых бактерий [5]. Разница в развитии пропионовокислых бактерий начала проявляться с момента перемещения сыра в «теплую» камеру, т. е. с 10 по 25 сутки созревания.

В сырах, выработанных с молокосвертывающим препаратом Chy-max Extra 600, после 15 суток пропионовокислые бактерии начали развиваться быстрее и к концу нахождения сыра в «теплой» камере, т. е. к 25 суткам созревания, достигли содержания жизнеспособных клеток $(3,7 \pm 0,1) \times 10^8$ КОЕ/г. В сыре, выработанном с ферментом Chy-max Suprime 100, содер-

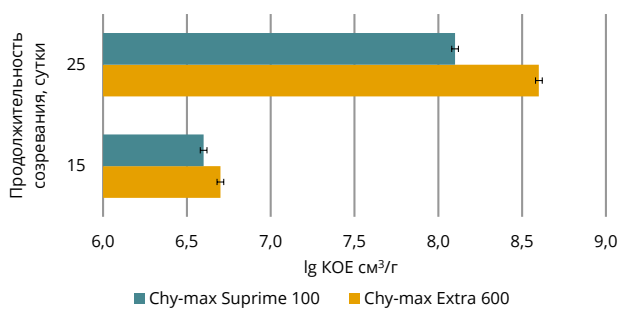


Рисунок 4. Изменение количества пропионовокислых бактерий в сырах во время нахождения в «теплой» камере



а



Источник изображения: freerik.com

жание пропионовокислых бактерий к 25 суткам созревания было на уровне $(1,5 \pm 0,1) \times 10^8$ КОЕ/г. Таким образом, в сыре с более высоким уровнем протеолиза количество пропионовокислых бактерий к концу нахождения в «теплой» камере превышало аналогичный показатель в сыре с более низким уровнем протеолиза более чем в 2 раза. Это подтверждает результаты ранее проведенных нами исследований на модельных средах, показавшие, что для активного развития пропионовокислых бактерий требуются азотистые вещества в доступной форме [6, 7].

На рисунке 5 приведены фотографии срезов экспериментальных сыров в кондиционной степени зрелости.

Из представленных рисунков видно, что образование газа и, соответственно, рисунка сыра происходило активнее в сыре, выработанном с ферментом Chy-max Extra 600 с высокой протеолитической активностью. Данный факт коррелирует с более высоким уровнем протеолиза в сырах, выработанных с ферментом Chy-max Extra 600 и скоростью развития пропионовокислых бактерий в этих сырах.



б

Рисунок 5. Рисунок экспериментальных сыров в зависимости от протеолитической активности молокосвертывающих ферментов: а) высокая (Chy-max Extra 600) ; б) низкая (Chy-max Suprime 100)



Источник изображения: freepik.com

Выводы

Проведенными исследованиями подтверждена тесная связь между развитием пропионовокислых бактерий и количеством продуктов протеолиза в сыре, которое зависит от протеолитической активности молокосвертывающего фермента.

Использование молокосвертывающих ферментов с высокой протеолитической активностью приводит к накоплению большего количества пептидов, что способствует увеличению популяции пропионовокислых бактерий *P. freudenreichii*, интенсификации газообразования и, как следствие, формированию более развитого рисунка сыра. Это необходимо учитывать при подборе ферментных препаратов и основной заквасочной микрофлоры, обладающих протеолитической активностью.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о возможности регулирования процесса газообразования в сырах, созревающих с участием пропионовокислых бактерий, путем сочетания протеолитической активности используемого молокосвертывающего ферментов препарата с продолжительностью нахождения сыра в «теплой» камере созревания. ■

Поступила в редакцию: 13.01.2025
Принята в печать: 27.02.2025

Semi-Hard Cheeses with Propionic Acid Fermentation

Olga V. Lepilkina, Tatyana S. Smirnova, Anastasija I. Grigorieva, Grigory N. Rogov

All-Russian Research Institute of Butter and Cheese Production, Gorbатов Research Center for Food Systems, Uglich

Milk-clotting enzymes with particular proteolytic properties can control gas formation in semi-hard cheeses obtained by propionic acid fermentation. Slow development of propionic acid bacteria and low gas formation result in a poor eye pattern. On the contrary, enhanced early proteolysis provides propionic acid bacteria with enough nutrition to boost their growth. The authors compared the propionic acid fermentation (*Propionibacterium freudenreichii*) of semi-hard cheeses made with milk-clotting enzymes with high (600 IMCU/mL) and low (100 IMCU/mL) proteolytic profiles. The degree of proteolysis was detected using the Kjeldahl method and peptide profiles obtained by high-resolution gel filtration (AKTA pure 25, Sweden). The amount of peptides in the water-soluble fraction was determined by chromatograms and the peak areas of peptides with different molecular weights. The development rate of propionic acid bacteria correlated with the amount of proteolysis products in cheese, which is known to depend on the proteolytic activity of the milk-clotting enzyme. In this study, milk-clotting enzymes with high proteolytic activity sped up the peptide formation, thus increasing the bacterial count, facilitating gas formation, and developing a stronger eye pattern. A proper ratio of proteolytic activities and the main starter microflora may regulate the process of gas formation in cheeses with propionic acid bacteria.

Keywords: cheese, propionic acid bacteria, proteolysis, peptide profile, gas formation, cheese eye pattern

Список литературы

1. **Bücher, C.** Propionic acid bacteria in the food industry: An update on essential traits and detection methods / C. Bücher, J. Burtscher, K. J. Domig // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2021. Vol. 20(5). P. 4299–4323. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12804>
2. **Fröhlich-Wyder, M.-T.** Cheeses With Propionic Acid Fermentation / M.-T. Fröhlich-Wyder [et al.]. – *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. – Academic Press, 2017. P. 889–910. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417012-4.00035-1>
3. **Орлова, Т. Н.** Пропионовокислые бактерии и их значение / Т. Н. Орлова, И. А. Функ, Е. Ф. Отт, Р. В. Дорофеев // *Сыроделие и маслоделие*. 2020. № 2. С. 28–29. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-1-28-29>; <https://elibrary.ru/ueueui>
4. **Мироненко, И. М.** Формирование видовых особенностей сыров с высокой температурой второго нагревания / И. М. Мироненко, Н. И. Бондаренко, Д. А. Усатюк // *Сыроделие и маслоделие*. 2018. № 5. С. 42–47. <https://elibrary.ru/yzjeup>
5. **Thierry, A.** New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii* / A. Thierry [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. 2011. Vol 149. № 1. P.19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026>
6. **Смирнова, Т. С.** Влияние гидролизата молока на газообразование пропионовокислых бактерий / Т. С. Смирнова, Г. Н. Рогов // *Инновационные биотехнологии природных и синтетических биологически активных веществ: Материалы IX международной научно-практической конференции*. Ставрополь, 2024. С. 333–336. <https://elibrary.ru/ykbzow>
7. **Смирнова, Т. С.** Газообразующая активность пропионовокислых бактерий / Т. С. Смирнова // *Международная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов отделения сельскохозяйственных наук Российской академии наук*. 2024. № 1. – С. 229–234. <https://www.elibrary.ru/aebkik>