

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-45-55>



<https://www.fsjour.com/jour>

Научная статья

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ПРОТЕОЛИЗА В СЫРАХ И АРОМАТИЧЕСКИХ ДОБАВКАХ С СЫРНЫМ ВКУСОМ

Мягконосов Д. С. *, Абрамов Д. В., Овчинникова Е. Г., Краюшкина В. Н.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия — филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН, Углич, Ярославская область, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

молекулярно-массовое распределение, пептиды, коэффициент поглощения, триптофан

АННОТАЦИЯ

Спектрофотометрический метод измерения содержания белка может использоваться для оценки степени протеолиза в сырах. На длине волны 280 нм поглощают триптофан, тирозин, высокое количество которых содержится в казеине — основном белке сырной массы. Установлено, что величина коэффициента поглощения раствора белков, экстрагированных из вкусоароматических добавок с сырным вкусом (ВАД) и сыров, зависит от степени протеолиза белков сырной массы и отличается у ВАД и сыров разных видов. Наибольший коэффициент поглощения 1%-го раствора отмечается для образцов ВАД ($k = 10,30$), в которых от 65 до 81% белка переведено в растворимое состояние. У сыров степень протеолиза составляет от 23 до 33%, а коэффициент поглощения 1%-го раствора k — от 1,1 до 2,4 (за исключением сыра Чеддер), что говорит о неполном переходе поглощающих излучение на 280 нм аминокислот в состав экстракта, выделяемого из сыров. При помощи спектрофотометрического метода могут быть получены результаты измерения содержания растворимого белка в сыре, строго коррелирующие с результатами, получаемыми методом Кьельдаля ($R^2 > 0,81$). Для получения достоверных результатов оценки содержания водорастворимого белка в сырах необходимо проводить измерения на выборке сыров, относящихся к одной и той же видовой группе, имеющих одинаковую специфику протеолиза и мало отличающийся между образцами внутри выборки коэффициент поглощения.

Available online at <https://www.fsjour.com/jour>

Original scientific article

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR EVALUATING PROTEOLYSIS IN CHEESES AND AROMATIC ADDITIVES WITH A CHEESY TASTE

Dmitriy S. Myagkonosov*, Dmitriy V. Abramov, Elena G. Ovchinnikova, Valentina N. Krayushkina

All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking — Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS, Uglich, Yaroslavl Region, Russia

KEY WORDS: molecular-mass distribution, peptides, absorbance coefficient, tryptophan

ABSTRACT

The spectrophotometric method for measuring protein content can be used to evaluate the degree of proteolysis in cheeses. At a wavelength of 280 nm, tryptophan and tyrosine are absorbed, a high amount of them is found in casein, the main protein of cheese mass. It was found that the value of the absorbance coefficient of the solution of proteins extracted from flavoring additives with cheese flavor (FA) and cheeses depends on the degree of proteolysis of proteins in the cheese mass and differs in FA and different types of cheeses. The highest absorbance coefficient is observed in the FA samples $A_{1\%1cm} = 10.30$, in which from 65 to 81% of the protein is converted into a soluble state. In cheeses, the degree of proteolysis is from 23 to 33%, and the absorbance coefficient of solution is from 1.1 to 2.4 (with the exception of Cheddar cheese), which indicates an incomplete transition of amino acids absorbing radiation at 280 nm into the extract released from cheeses. Using the spectrophotometric method, the results of measuring the content of soluble protein in cheeses and FA, strictly correlating with the results achieved by the Kjeldahl method ($R^2 > 0.81$), can be obtained. To get reliable results of evaluating the content of water-soluble protein in cheeses, it is necessary to carry out measurements on a sample of cheeses belonging to the same species group, having the same specificity of proteolysis and slightly different absorbance coefficient between samples within the instance.

1. Введение

В последние 10 лет отмечается серьезный прогресс во внедрении новых методов для исследования показателей качества сыров. В научных работах за указанный период используются методы исследований, позволяющие получать новые данные и открывать новые закономерности, что было недоступно при использовавшихся ранее методах исследований. К современным методам ис-

следований состава и качества сыров относятся: системы машинного зрения, компьютерная томография, рентгено-скопия, магнитно-резонансная томография, флуоресцентная спектроскопия, ИК-спектроскопия в ближней инфракрасной области, ИК-спектроскопия с преобразованием Фурье, гиперспектральная томография, рамановская спектроскопия, ультразвуковое зондирование и ряд других методов [1].

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Мягконосов, Д.С., Абрамов, Д.В., Овчинникова, Е.Г., Краюшкина, В.Н. (2021). Спектрофотометрический метод оценки протеолиза в сырах и ароматических добавках с сырным вкусом. *Пищевые системы*, 4(1), 45–55. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-45-55>

FOR CITATION: Myagkonosov, D.S., Abramov, D.V., Ovchinnikova, E.G., Krayushkina, V.N. (2021). Spectrophotometric method for evaluating proteolysis in cheeses and aromatic additives with a cheese taste. *Food systems*, 4(1), 45–55. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-1-45-55>

Метод ядерного магнитного резонанса был использован в работе [2] для изучения метаболитов, содержащихся в водных экстрактах из сыров Чеддер, с целью выбора их в качестве факторов математической модели, позволяющей предсказывать качество сыров в конце срока созревания.

Анализ состава сыров методами флуоресцентной спектроскопии, ИК-спектроскопии в ближней инфракрасной области (NIR), ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR), наряду со стандартными методами анализа был проведен в работе [3] в целях определения состава сыров и предсказания их качества в конце срока созревания.

Потенциальные возможности использования метода ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье были исследованы в работе [4] для оценки широкого диапазона химических показателей (содержание влаги, белка, жира, золы, отдельных жирных кислот в жировой фазе), характеризующих качество зрелых сыров.

Методы ИК-спектроскопии в ближней и средней инфракрасной области наряду с традиционными методами исследований были использованы в работе [5] для определения химического состава и показателей качества сыров, включающих содержание влаги, белка, отдельных белковых фракций, жира, соли, золы, титруемой и активной кислотности.

Результаты перечисленных выше исследований показали, что замена методов сенсорной оценки качества сыров на инструментальные методы является трудно разрешимой задачей, но можно с успехом использовать спектроскопические методы анализа взамен традиционных методов измерения химических показателей для экспрессной оценки широкого диапазона анализируемых показателей существенно снизив за счет этого трудовые и экономические затраты на проведение анализов.

Показателем, традиционно используемым для характеристики степени зрелости сыров является протеолиз белков сырной массы. Протеолиз непосредственно влияет на формирование консистенции и вкуса сыров, а также является индикативным показателем степени зрелости сыра, т. к. параллельно с процессом протеолиза идут процессы гликолиза, липолиза и ряд других процессов, происходящих при созревании сыров. Увеличение интенсивности протеолиза свидетельствует об увеличении интенсивности других биохимических процессов в созревающих сырах.

Для оценки протеолиза разработано большое число методов, базирующихся на разных принципах.

Метод Кьельдаля традиционно используется для определения в сырах общего содержания белка и отдельных азотистых фракций, после предварительного фракционирования [6,7,8].

Метод Кьельдаля основан на определении содержания азота в образце с пересчетом содержания азота в содержание белка через коэффициент, являющийся константой для каждого определенного вида белков. Метод отличается высокой воспроизводимостью и пригоден для определения содержания азотистых веществ (белков, пептидов, свободных аминокислот, аминов, аммиака) в твердых, пластичных или мутных образцах [7,9]. Принципиальным недостатком метода Кьельдаля является его трудоемкость, длительное время выполнения анализа, использование агрессивных реагентов, опасных для персонала [6,10,11].

Вследствие этого, вопрос о разработке быстрого и точного метода для оценки содержания продуктов протеолиза в сырах сохраняет свою актуальность. Методы оценки протеолиза в сырах, основанные на определении количества свободных аминокислот, рассмотрены в предыдущей работе авторов [12]. Данные методы дают адекватную оценку степени протеолиза в сыре по количеству гидролизованных

пептидных связей в белке. Недостатком таких методов является отсутствие прямой связи между получаемыми с их помощью результатами и результатами традиционно используемого метода Кьельдаля.

Рассмотрим методы, дающие оценку протеолиза по содержанию растворимого белка, результаты которых прямо пропорциональны результатам, получаемым с помощью метода Кьельдаля.

Метод Халла (Hull procedure) основывается на выделении продуктов протеолиза, растворимых в трихлоруксусной кислоте (пептиды и свободные аминокислоты), окрашивании их реактивом Фолина-Чикелтау, реагирующим с остатками триптофана и тирозина, с образованием комплекса, имеющего синюю окраску с максимумом поглощения на длине волны ~650 нм. Недостатками метода Халла является его достаточно низкая чувствительность, связанная в т. ч. с удалением трихлоруксусной кислотой из анализируемого образца части продуктов протеолиза, а также громоздкость при выполнении большого числа анализов [11,13].

Метод Лоури основан на двух последовательных реакциях. Первая реакция состоит в образовании комплекса между ионом меди и амидной связью, который обладает редуцирующими свойствами в щелочной среде. Данный комплекс называется «биуретовым хромофором». Вторая реакция заключается в редуцировании реактива Фолина-Чикелтау образовавшимся ранее комплексом из ионов меди и амидных связей. Редуцированный реактив Фолина-Чикелтау приобретает интенсивную синюю окраску, которая детектируется на длине 500–750 нм. Результаты метода Лоури могут искажаться при наличии в буфере для растворения образца многих веществ: детергенты, углеводы, глицерин, Трицин, ЭДТА, Трис, соли калия, серосодержащие соединения, дисульфидные группы, большинство фенолов, мочева кислота, гуанин, ксантин, ионы магния и кальция. Также на результаты метода Лоури влияет содержание триптофана и тирозина в анализируемом белковом материале [14].

Метод Лоури с успехом используется для определения содержания продуктов протеолиза в сырах. Это связано с тем, что при экстракции водорастворимых продуктов протеолиза из сыров не требуется использования реагентов, влияющих на результаты метода Лоури. Лежащая в основе метода биуретовая реакция обладает чувствительностью к продуктам протеолиза с любой молекулярной массой (к белкам, к пептидам любых размеров и даже к свободным аминокислотам) [15]. При определении содержания водорастворимых азотистых фракций в сыре Чеддер, Wallis установил, что метод Лоури дает результаты точно коррелирующие ($R^2 = 0,971$) с результатами метода Кьельдаля [11].

Недостатком метода Лоури является его трудоемкость и длительное время анализа (до 1,5 ч) [14], что сравнимо по трудоемкости с методом Кьельдаля.

Спектрофотометрические методы измерения содержания белка основаны на способности белковых молекул интенсивно поглощать кванты УФ-излучения в диапазоне 190–280 нм. Пептидные связи интенсивно поглощают кванты излучения с длиной волны менее 210 нм. Недостатком измерений концентрации белка в диапазоне менее 210 нм, является поглощение в данном диапазоне других, небелковых веществ, содержащих двойные связи между молекулами углерода или углерода и кислорода. На длине волны 280 нм детектируются свободные аминокислоты (главным образом, триптофан и тирозин), которые не обнаруживаются на длинах волн 205–220 нм [16]. При этом на 280 нм отмечается наличие поглощения только у малого числа химических веществ, поэтому, длина волны 280 нм была признана более

подходящей для оценки содержания белка, чем более короткие длины волн [17].

Спектрофотометрический метод измерения концентрации белка по поглощению УФ-излучения с длиной волны 280 нм имеет множество преимуществ в сравнении с другими методами [9]:

- высокая точность определения содержания измеряемого вещества, даже при очень малых концентрациях;
- измерения выполняются без добавления дополнительных реагентов (не считая буфера для разведения образца);
- измерения могут быть выполнены очень быстро, без предварительной инкубации;
- отсутствие сдвига в величине поглощения бланка и раствора анализируемого вещества с течением времени;
- для растворения белка можно применять высокие концентрации детергентов или редуцирующих веществ, что недопустимо для метода Лоури.

К недостаткам спектрофотометрического метода относятся:

- на длине волны 280 нм практически не обнаруживаются пептиды, не содержащие ароматические аминокислоты и большинство свободных аминокислот (кроме триптофана, тирозина, и в меньшей степени, цистеина) [18]; вследствие этого часть малых пептидов может не детектироваться на длине волны 280 нм, т. к. со значительной вероятностью такие пептиды не будут содержать тирозина и триптофана, поглощающих на длине волны 280 нм [19];
- анализируемый раствор белка должен быть оптически прозрачным; механические частицы или микроскопические капли липидов должны быть удалены из раствора, т. к. они обладают свойством интенсивно рассеивать излучение с короткой длиной волны [17];
- высокая чувствительность метода приводит к реагированию на загрязнение кюветы [14];
- необходимо использование дорогостоящих спектрофотометров, работающих в УФ-диапазоне ($\lambda \leq 340$ нм).

Самой главной проблемой спектрофотометрического метода является необходимость определения коэффициента поглощения белка. В выделяемом для анализа экстракте из сыра присутствует смесь из пептидов и свободных аминокислот, процентное содержание триптофана и тирозина в которой отличается от содержания триптофана и тирозина в параказеине сырной массы. Установлено, что коэффициент поглощения гидролизованного казеина изменяется в зависимости от степени гидролиза [20]. Степень гидролиза белка сырной массы влияет на содержание триптофана и тирозина в составе растворимой фракции продуктов протеолиза. В сырах на ранней стадии созревания альфа-S1-казеин гидролизует с N-терминала с высвобождением пептидов, не содержащих триптофана и тирозина. Такие пептиды практически не поглощают УФ-излучение на длине волны 280 нм. Содержащие тирозин (но не триптофан) пептиды образуются в сыре при гидролизе бета-казеина на поздних стадиях созревания [6,11].

Тем не менее, спектрофотометрический метод измерения концентрации белка по поглощению УФ-излучения с длиной волны 280 нм нашел применение при оценке протеолиза в сырах.

Vakaleris & Price [21] разработали и первыми успешно применили спектрофотометрический метод для оценки протеолиза в образцах сыра Чеддер.

Schroeder et al [22] с помощью спектрофотометрического метода Vakaleris & Price исследовали степень протеолиза в образцах сыра Чеддер, содержащих разное количество поваренной соли. Эти результаты оценки степени протеолиза хорошо соотносились с показателями зрелости сыров, полученными методами органолептической оценки.

Lin et al [23] использовали модификацию спектрофотометрического метода Vakaleris & Price для оценки степени протеолиза в образцах голубых сыров, созревающих с участием плесени *Penicillium roqueforti*, и получили неоднозначные результаты при сравнении с результатами оценки протеолиза по методу Халла.

Ivens et al [24] с успехом использовали спектрофотометрический метод по поглощению на длине волны 280 нм для оценки протеолиза в сыре Чеддер, но сделали вывод, что этот метод менее чувствителен, чем метод Лоури.

Исходя из приведенных выше данных, можно сделать вывод, что среди методов оценки протеолиза в сыре, спектрофотометрический метод измерения концентрации белка по поглощению УФ-излучения с длиной волны 280 нм имеет несомненные достоинства и перспективен для использования при проведении исследовательских работ в виду простоты и быстроты выполнения. При этом присутствуют сведения от отдельных исследователей о проблемах с точностью данного метода при оценке протеолиза в сырах. Целью настоящей работы является проверка возможностей применения спектрофотометрического метода анализа и установление границ применения данного метода при оценке протеолиза в сырах.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

В качестве объектов исследований были выбраны твердые и полутвердые сыры, купленные в торговой сети, а также образцы сыра «Голландский» и образцы натуральных вкусоароматических добавок (ВАД) с сырным вкусом, изготовленные во ВНИИМС.

2.2 Методы

2.2.1 Изготовление сыров и ВАД

Регламент производства сыров и ВАД описан в предыдущей работе авторов [12].

2.2.2 Методы исследования свойств сыров и ВАД

Определение массовой доли влаги проводили методом высушивания при температуре 102 ± 2 °С по российскому государственному стандарту ГОСТ 3626–73¹.

Определение массовой доли общего и растворимого азота — методом Кьельдаля по российскому государственному стандарту ГОСТ Р 54662–2011².

Степень протеолиза в сырах выражали в процентах абсолютного содержания растворимого азота (water soluble nitrogen (WSN)) от абсолютного содержания общего азота (total nitrogen (TN)).

Содержание белка в сырах вычисляли по формуле:

$$B\% = 6,38 \times A\%, \quad (1)$$

где B% — массовая доля белка в образце, %;

A% — массовая доля азота в образце, измеренная методом Кьельдаля, %

6,38 — коэффициент пересчета [10].

Определение массовой доли жира — кислотным методом по российскому государственному стандарту ГОСТ Р 55063–2012³.

2.2.3 Подготовка образцов сыров и ВАД для оценки протеолиза

Образцы сыров и ВАД коллекционировали, для чего из них приготавливали сухие обезжиренные препараты. Обезжиривание проводили ледяным гексаном по методу,

¹ ГОСТ 3626–73 Молоко и молочные продукты. Методы определения влаги и сухого вещества. М.: Стандартинформ, 2009. — 11 с.

² ГОСТ Р 54662–2011 Сыры и сыры плавленные. Определение массовой доли белка методом Кьельдаля. М.: Стандартинформ, 2012. — 16 с.

³ ГОСТ Р 55063–2012 Сыры и сыры плавленные. Правила приемки, отбор проб и методы контроля. М.: Стандартинформ, 2013. — 28 с.

описанному в работе [24] с модификациями. Для этого навеску из $20,0 \pm 1,0$ г сыра или ВАД смешивали с 60 см^3 гексана в конической колбе на 500 см^3 с притертой пробкой и выдерживали в холодильнике при минус 18°C в течение 1 ч с периодическим встряхиванием. Порцию гексана с экстрагированным жиром сливали, после чего приливали свежую порцию гексана такого же объема и процедуру обезжиривания повторяли. Экстракцию жира выполняли трехкратно. Обезжиренный образец высушивали под потоком воздуха при комнатной температуре в течение 3 ч. Для ВАД после высушивания повторяли еще один цикл обезжиривания и высушивания. Полученные сухие обезжиренные препараты сыров и ВАД запечатывали в пластиковые пакеты с zip-замками и хранили до анализа при температуре минус 18°C .

Для получения водных экстрактов, содержащих водорастворимые продукты протеолиза, готовили разведения сухих образцов.

Для получения водных экстрактов из ВАД, навеску $2,5$ г сухого обезжиренного препарата ВАД смешивали с 50 см^3 деионизированной воды, выдерживали в течение 30 мин при непрерывном перемешивании 200 мин^{-1} на орбитальном шейкере SK-O180-E (DLAB Scientific Co., Ltd, Китай), после чего гомогенизировали на высокоскоростном гомогенизаторе FSH-2A (Jiangsu Jinyi Instrument Technology Company Limited, Китай) в течение 1 мин. Смесь переносили в мерную колбу, доводили объем деионизированной водой до 100 см^3 (получали смесь с массовой долей сухого вещества $2,5\%$) и фильтровали на бумажном фильтре, а затем на фильтрах из ацетата целлюлозы с размером пор $0,45 \text{ мкм}$ (Владипор, Россия). Полученный фильтрат использовали для определения содержания водорастворимого азота по методу Кьельдаля. Для измерения оптической плотности на спектрофотометре экстракт, подготовленный для определения содержания азота по методу Кьельдаля, растворяли деионизированной водой в соотношении 1:10 (получали смесь с массовой долей сухого вещества $0,25\%$). Для определения молекулярно-массового распределения методом жидкостной хроматографии экстракт, подготовленный для определения содержания азота по методу Кьельдаля, смешивали с деионизированной водой в соотношении 6:4 (получали смесь с массовой долей сухого вещества $1,0\%$).

Для получения водных экстрактов из сыров, навеску сухого обезжиренного препарата сыра ($4,0$ г для образцов сыра Голландский производства ВНИИМС или $3,0$ г для сыров, купленных в розничной сети) смешивали с 50 см^3 деионизированной воды, выдерживали в течение 30 мин при непрерывном перемешивании, после чего гомогенизировали на высокоскоростном гомогенизаторе. Смесь переносили в мерную колбу, доводили объем деионизированной водой до 100 см^3 (получали смесь с массовой долей сухого вещества $4,0\%$ для сыра Голландский производства ВНИИМС или $3,0\%$ для сыров, купленных в розничной сети) и фильтровали на бумажном фильтре, а затем на фильтрах из ацетата целлюлозы с размером пор $0,45 \text{ мкм}$ (Владипор, Россия). Полученный фильтрат использовали для измерения оптической плотности на спектрофотометре. Для определения содержания азота по методу Кьельдаля экстракт, подготовленный для определения оптической плотности на спектрофотометре, смешивали с деионизированной водой (в соотношении 10:6 для сыра Голландский производства ВНИИМС или 10:2 для сыров, купленных в розничной сети) и получали смесь с массовой долей сухого вещества $2,5\%$. Для определения молекулярно-массового распределения методом жидкостной хроматографии готовили смесь с массовой долей сухого вещества $4,0\%$ для всех видов сыров.

2.2.4 Молекулярно-массовое распределение продуктов протеолиза

Определение молекулярно-массового распределения растворимых азотистых веществ в водном экстракте из сыров и ВАД проводили методом гель-фильтрации высокого разрешения с использованием колонки Superose 12 10/300 GL (GE Healthcare, Швеция). Элюент — водный раствор $0,05 \text{ M Na}_2\text{HPO}_4 + 0,15 \text{ M NaCl}$, скорость подачи элюента — $0,5 \text{ мл/мин}$; длина волны детектора — 280 нм . Калибровку колонки проводили по времени выхода белковых веществ с известной молекулярной массой: IgG (180 кДа), альдолаза (158 кДа), BSA (69 кДа), овоальбумин (43 кДа), β -Lg ($36,0 \text{ кДа}$), α -La ($14,4 \text{ кДа}$), цитохром C ($12,3 \text{ кДа}$), триптофан ($0,204 \text{ кДа}$). Калибровочный график был построен на основе логарифмической регрессионной модели [25].

2.2.5 Оптическая плотность

Определение оптической плотности проводили в водных экстрактах из сыров и ВАД, приготовленных по п. 2.2.3 на спектрофотометре LEKI model SS1207UV (MEDIORA OY, Финляндия) в кварцевых кюветках с длиной оптического пути 10 мм при длине волны $\lambda = 280 \text{ нм}$.

Математическая обработка выполнена с использованием программных пакетов Microsoft Excel и Statsoft Statistica.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Обоснование метода подготовки пробы

В работах исследователей, критикующих спектрофотометрический метод измерения концентрации белка по поглощению УФ-излучения с длиной волны 280 нм за его низкую точность в сравнении с референтными методами, можно найти объяснение причины таких результатов.

Lin et al [23] получили неоднозначные результаты при сравнении результатов оценки протеолиза спектрофотометрическим методом Vakaleris & Price, в котором экстракция продуктов протеолиза производится кислотным буфером (pH 4,4), с результатами оценки протеолиза по методу Халла, в котором экстракция продуктов протеолиза проводится с помощью раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ). Причиной расхождения результатов, полученных сравниваемыми методами, может быть различие в процедуре экстракции продуктов протеолиза в данных методах. ТХУ используется для освобождения экстрактов, выделенных из сыров с помощью воды или кислого буфера (pH 4,4–4,6) от фракции белков и крупных пептидов. При экстракции ТХУ из раствора удаляется часть азотистых веществ, которые содержатся в экстрактах, получаемых с помощью кислого буфера (pH 4,4) [6].

Ivens et al [24] сделали вывод, что для оценки протеолиза в сыре Чеддер спектрофотометрический метод менее чувствителен, чем метод Лоури. Причиной получения подобных результатов была использованная Ivens et al методика выделения продуктов протеолиза, с применением 5% -го раствора NaCl, обладающая низкой селективностью. Установлено, что более 90% белковых веществ в сыре Чеддер растворимы в 5% растворе NaCl [26], поэтому при таком методе экстрагирования в экстракт переходят в т. ч. белки, не затронутые протеолизом.

Метод оценки содержания продуктов протеолиза спектрофотометрическим методом, разработанный Vakaleris and Price, предусматривает экстрагирование продуктов протеолиза, растворимых при pH 4,4. В практике российского сыроделия для оценки степени протеолиза более применимым является показатель содержания водорастворимого азота в сырах [8], поэтому на первой стадии исследований было проведено сравнение состава экстрактов, получаемых при выделении растворимых продуктов протеолиза из сыров и ВАД с помощью воды и с помощью кислого раствора.

На Рисунке 1 приведены хроматограммы продуктов протеолиза, полученных из ВАД и сыров путем экстрагирования водой при подкислении экстракта раствором соляной кислоты до pH 4,4 и без подкисления (с добавлением количества воды, равного количеству кислоты для компенсации фактора разведения).

Сравнение молекулярно-массового распределения в водных и подкисленных экстрактах из ВАД и сыров, приведенных на Рисунке 1, наглядно показывает, что при экстрагировании из ВАД и сыров продуктов протеолиза с помощью подкисленного растворителя (pH 4,4) из раствора удаляется часть пептидного материала с молекулярной массой выше

5 кДа, содержащего триптофан и тирозин. Это снижает в образце долю белковых веществ, поглощающих излучение с длиной волны 280 нм, поэтому для адекватного сравнения степени протеолиза в образцах сыров, целесообразнее использовать метод экстракции водой.

3.2 Оценка содержания белка спектрофотометрическим методом

График, отражающий зависимость оптической плотности на длине волны 280 нм водных экстрактов из ВАД и сыров от концентрации белка в данных экстрактах (определенном методом Кьельдаля), приведен на Рисунке 2.

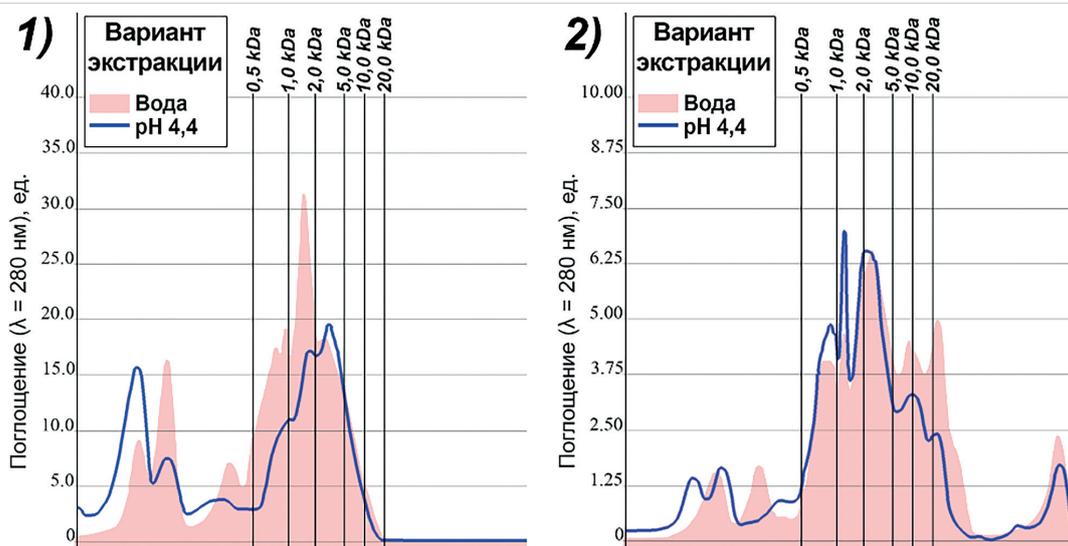


Рисунок 1. Молекулярно-массовое распределение в экстрактах, полученных: 1) из ВАД или 2) из сыров, путем экстрагирования водой (вариант экстракции — вода) или раствором соляной кислоты при кислотности экстракта pH 4,4 (вариант экстракции — pH 4,4)

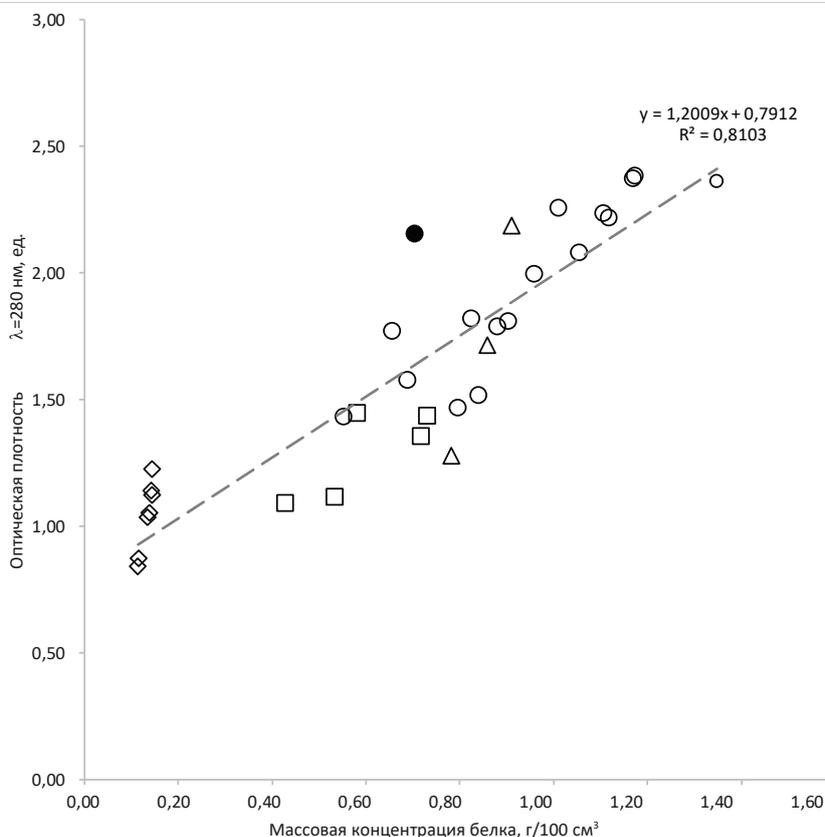


Рисунок 2. Зависимость поглощения на длине волны 280 нм от концентрации белка в водных экстрактах из образцов: \diamond — ВАД; \square — твердые сыры; Δ — сыр Чеддер; \bullet — сыр Гауда; \circ — сыр Голландский

Графическая зависимость, представленная на Рисунке 2, показывает, что поглощение водных экстрактов из ВАД и сыров на длине волны 280 нм коррелирует с содержанием белка в данных экстрактах. При этом можно отметить следующее:

- отмечается значительная вариация фактически измеренных значений оптической плотности относительно сглаживающей линии регрессии;
- точки данных, относящиеся к ВАД и к сырам одного вида, группируются в компактные области.

Это говорит о существовании разных зависимостей оптической плотности от содержания белка в пробе для каждой группы продуктов (ВАД и сыры разного вида). Необходимо построение отдельных регрессионных зависимостей для каждой группы продуктов.

Экспериментальные данные были сглажены уравнением линейной регрессии вида:

$$OD_{280} = k \cdot Prot + c, \tag{2}$$

где OD_{280} — оптическая плотность раствора на длине волны 280 нм;
 $Prot$ — концентрация белка в растворе, г/100 см³;
 k — коэффициент пропорциональности;
 c — константа уравнения.

После разделения на подгруппы было отмечено значительное улучшение качества сглаживания. Значения коэффициентов регрессионной модели зависимости оптической плотности от содержания белка в пробе для разных групп сыров и ВАД приведены в Таблице 1.

Из данных, приведенных в Таблице 1 следует, что регрессионные модели, построенные для выборок, более однородных по составу включенных продуктов (сыры одинаковых видов, ВАД), характеризуются более высокой степенью статистической достоверности по величине коэффициента детерминации.

Коэффициенты уравнения регрессии имеют физический смысл. Константа уравнения c равна оптической плотности

раствора при нулевом содержании белка. При имеющейся стохастической, а не строго функциональной зависимости оптической плотности от концентрации белка, константа уравнения должна быть статистически достоверно не отлична от нуля (при принятом уровне значимости $p < 0,05$). При c , не отличном от 0, зависимость (2) упрощается и принимает вид:

$$OD_{280} = k \cdot Prot, \tag{3}$$

Полученное уравнение, описывающее зависимость величины поглощения раствора от концентрации абсорбирующего вещества в растворе, называется законом Ламберта-Бэра (Lambert-Beer law). Коэффициент пропорциональности k называется в научной литературе «коэффициент поглощения 1%-го раствора» и равен оптической плотности раствора концентрацией 1 г / 100 см³ [14]. Коэффициент поглощения белка определяется содержанием в нем аминокислот, наиболее интенсивно поглощающих на длине волны 280 нм: триптофана, тирозина и, в меньшей степени, цистеина [18]. Отличие константы уравнения (2) c от нуля говорит о том, что для данной выборки образцов закон Ламберта-Бэра не соблюдается, ввиду значительной вариабельности коэффициентов поглощения образцов, составляющих выборку.

Коэффициент поглощения смеси пептидов, содержащихся в экстрактах из сыров, зависит от доли белка, переведенного в результате протеолиза в растворимое состояние. Чем выше степень протеолиза, тем большая доля поглощающих УФ-излучение 280 нм аминокислот переходит в состав растворимых пептидов [11], поэтому образцы, имеющие более высокую степень протеолиза, теоретически должны иметь более высокий коэффициент поглощения.

Наибольший коэффициент поглощения 1%-го раствора отмечается для образцов ВАД ($k = 10,30 \pm 1,35$), в которых от 65 до 81% белка переведено в растворимое состояние. Согласно данным Kirschenbaum [27], коэффициент поглощения 1%-го раствора параказеина равен 11,0. Коэффициент поглощения пептидного материала в экстракте из ВАД имеет

Таблица 1

Показатели регрессионной модели для разных групп сыров и ВАД

Выборка образцов		Коэффициенты уравнения линейной регрессии				Коэффициент детерминации уравнения регрессии (R ²)
Состав выборки	n	Коэффициент уравнения	Значение коэффициента	Ошибка оценки коэффициента	Уровень значимости оценки коэффициента (p)	
ВАД	7	<i>c</i>	-0,35454	0,181908	0,108806	0,92
		<i>k</i>	10,39088	1,351134	0,000593	
Сыры всех видов	25	<i>c</i>	0,474283	0,170564	0,010631	0,73
		<i>k</i>	1,543873	0,193368	0,000000	
Твердые сыры	5	<i>c</i>	0,648823	0,292218	0,113008	0,62
		<i>k</i>	1,064385	0,479455	0,113044	
Чеддер	3	<i>c</i>	-4,19011	0,861586	0,129105	0,98
		<i>k</i>	6,94948	1,010617	0,091935	
Голландский + Гауда	17	<i>c</i>	0,785957	0,217425	0,002547	0,67
		<i>k</i>	1,256255	0,228340	0,000061	
Голландский	16	<i>c</i>	0,600246	0,175089	0,004077	0,81
		<i>k</i>	1,421340	0,181336	0,000002	
Голландский (Naturen) *	8	<i>c</i>	-0,398772	0,290374	0,218765	0,92
		<i>k</i>	2,406891	0,293839	0,000178	
Голландский (Chy-max) *	4	<i>c</i>	0,800281	0,155761	0,035857	0,97
		<i>k</i>	1,197697	0,151642	0,015655	
Голландский (Fromase) *	4	<i>c</i>	0,807896	0,205331	0,058941	0,93
		<i>k</i>	1,279253	0,241820	0,033925	

Примечание:

* Образцы сыра Голландский производства ВНИИМС, изготовленные с использованием молокосвертывающих ферментов разного вида (названия торговых марок ферментов указаны в скобках).

Красным цветом выделены строки, относящиеся к коэффициентам уравнения регрессии, имеющими уровень статистической значимости $p < 0,05$.

чуть меньшую величину, что говорит о практически полном переходе поглощающих излучение на 280 нм аминокислот в состав экстракта.

У сыров степень протеолиза составляет от 23 до 33%, а коэффициент поглощения 1%-го раствора k — от 1,1 до 2,4 (за исключением сыра Чеддер), что говорит о неполном переходе поглощающих излучение на 280 нм аминокислот в состав экстракта.

Различия в величине коэффициента поглощения у сыров разных видов также связаны с различиями в специфике протеолиза в разных сырах, приводящими к образованию пептидов, содержащих разное количество поглощающих излучение на 280 нм аминокислот. Методом жидкостной хроматографии был установлен состав водорастворимых азотистых фракций, поглощающих излучение с длиной волны 280 нм, в сырах разных видов (Рисунок 3).

На основании результатов хроматографического анализа, представленных на Рисунке 3, можно сделать следующие выводы.

Образцы твердых сыров имеют заметно отличающуюся форму молекулярно-массового распределения, что связано с различиями в технологии их производства, приводящим к различиям в специфике протеолиза. Значительная вариабельность по составу продуктов протеолиза в выборке «твердые сыры» (Рисунки 3.1, 3.2) объясняет получение статистически недостоверной зависимости оптической плотности от содержания белка для выборки по данной группе сыров (Таблица 1).

Значительные отличия по содержанию и уровню поглощения растворимых пептидов в исследованных образцах сыра Чеддер от разных производителей (Рисунок 3.3), привели к получению статистически недостоверной регресси-

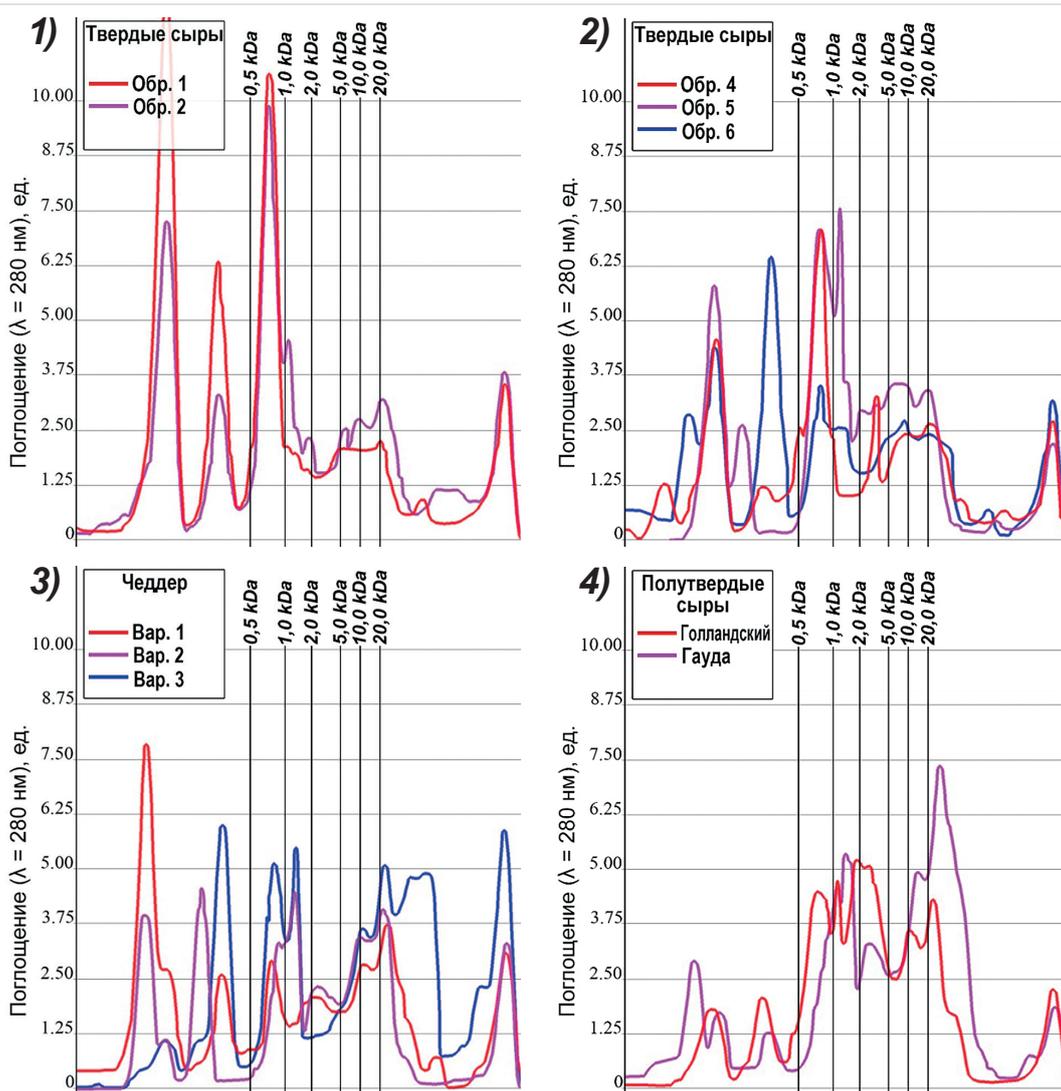


Рисунок 3. Состав водорастворимых азотистых фракций в сырах разных видов.

ТВЕРДЫЕ СЫРЫ:

- Образец 1 — Сыр «Swiss Emmentaler AOP» ТМ «Schonfeld» (Швейцария);
- Образец 2 — Сыр «Швейцарский» (Le Superbe Services AG, Швейцария);
- Образец 4 — Сыр Гойя ТМ «La Paulina» (Molfino Hnos S. A., Аргентина);
- Образец 5 — Сыр «Пармезан Делюкс» (ОАО «Молочный мир», Республика Беларусь);
- Образец 6 — Сыр «Пармезан Bravo» (ООО «Ровеньки-маслосырзавод», Россия);

СЫР ЧЕДДЕР:

- Вариант 1 — Сыр Чеддер (Le Superbe Services AG, Швейцария);
- Вариант 2 — Сыр Чеддер ТМ «La Paulina» (Molfino Hnos S. A., Аргентина);
- Вариант 3 — Сыр Чеддер ТМ «Валио» (ООО «Валио», Россия);

ГАУДА:

- Сыр Гауда ТМ «Валио» (ООО «Валио», Россия).

онной зависимости оптической плотности от содержания белка для выборки по данной группе сыров (Таблица 1).

Причина различий в содержании и аминокислотном составе продуктов протеолиза в исследованных сырах состоит в использовании отличающихся технологических режимов производства сыров (в т. ч. использование закваски разного видового состава, разных типов молокосвертывающих ферментных препаратов (МФП), различия в режимах посолки, созревания и ряде других параметров). Различия в специфике протеолиза приводят к образованию водорастворимых продуктов протеолиза с разным содержанием аминокислот, поглощающих излучение с длиной волны 280 нм.

Следствием различий в содержании аминокислот, поглощающих излучение с длиной волны 280 нм в продуктах протеолиза, является различие в коэффициенте поглощения водных экстрактов из сыров с разной спецификой протеолиза. Несмотря на то, что сыры Гауда и Голландский относятся к одной группе сыров и производятся по технологии, имеющей мало отличий, эти сыры имеют отличия по качественному составу продуктов протеолиза. На Рисунке 3.4 приведен состав растворимых азотистых продуктов протеолиза в сырах Гауда и Голландский, имеющих одинаковую степень протеолиза. Поэтому, регрессионная зависимость, построенная для выборки только по сыру Голландский, имеет более высокий уровень статистической достоверности, чем регрессионная зависимость, построенная по выборке, включающей сыр Голландский и сыр Гауда (Таблица 1).

Следует отметить, что разделение общей выборки по сыру Голландский на подвыборки, включающие сыры, произведенные с одинаковым типом МФП, позволяет получить для таких подвыборок регрессионные зависимости оптической плотности от содержания белка в пробе, имеющие еще более высокий уровень статистической достоверности. Причина этого заключается в том, что образцы сыра Голландский, произведенные с молокосвертывающими ферментами разного вида, имеют несколько разный состав продуктов протеолиза.

На рисунке 4.1 приведены хроматограммы содержания растворимых продуктов протеолиза в образцах сыра Голландский на разных стадиях созревания и хранения. На Рисунке 4.2 приведены хроматограммы образцов сыра

Голландский с одинаковой степенью протеолиза ($\approx 31\%$), произведенных с молокосвертывающими ферментами разного вида.

Из данных хроматографического анализа, приведенных на Рисунке 4, можно сделать следующие выводы. Образцы сыра Голландский, произведенные по одному варианту технологии с использованием разных МФП, имеют мало различий в качественном составе продуктов протеолиза на протяжении всего срока созревания и хранения сыра (Рисунок 4.1). При этом сыры, имеющие равную степень протеолиза, но изготовленные с использованием разных типов МФП, имеют небольшие отличия в молекулярно-массовом распределении продуктов протеолиза (Рисунок 4.2). Подобных отличий достаточно для получения отличающихся коэффициентов регрессионных моделей, описывающих зависимость оптической плотности от содержания белка для данных сыров (Таблица 1).

4. Заключение

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: поскольку разные сыры имеют разную специфику протеолиза, следствием этого является разное содержание поглощающих на 280 нм аминокислот в составе растворимой фракции, поэтому коэффициент поглощения у водных экстрактов из сыров разных групп будет отличаться.

С помощью спектрофотометрического метода можно сравнивать только сыры, произведенные по одинаковой технологии, имеющие слабые различия по содержанию поглощающих излучение с длиной волны 280 нм аминокислот в составе продуктов протеолиза. В своих работах Vakaleris и Price [21] и Schroeder et al [22] получили надежные зависимости оптической плотности экстрактов из сыров от степени протеолиза в сырах, при применении метода к однородной группе сыров (сыр Чеддер).

При использовании спектрофотометрического метода оценки степени протеолиза применительно к выборке по сыру Голландский, также были получены сравнимые результаты. Для примера, на Рисунках 5.1 и 5.2 приведены графики, отображающий сравнительную динамику протеолиза в образцах сыра Голландский, изготовленных по одинаковой технологии с применением разных видов МФП и созревающих при разной температуре.

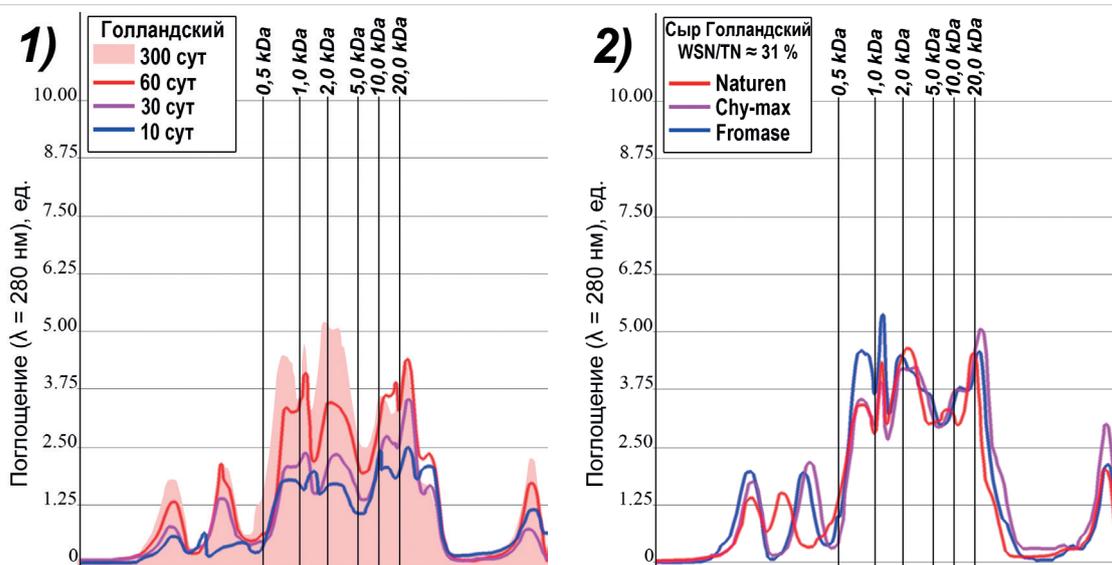
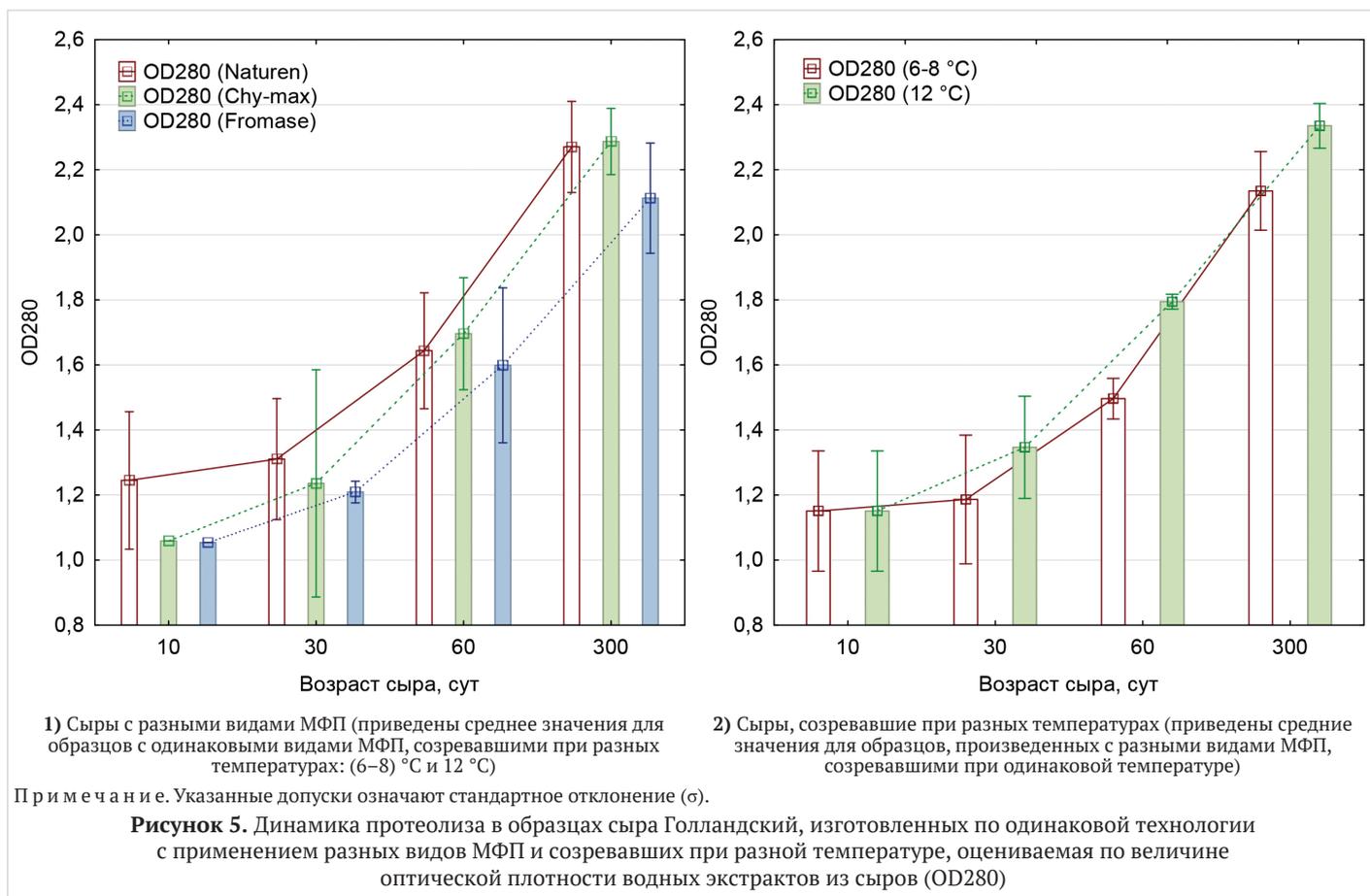


Рисунок 4. Содержание растворимых продуктов протеолиза в образцах сыра Голландский: 1) на разных стадиях созревания и хранения; 2) произведенных с молокосвертывающими ферментами разного вида и имеющих одинаковую степень протеолиза ($\approx 31\%$)



На основании данных, установленных при анализе литературы, а также в результате собственных исследований, можно заключить, что метод оценки содержания белка по поглощению УФ-излучения с длиной волны 280 нм может быть успешно использован для оценки протеолиза в сырах. Для получения достоверных результатов оценки

содержания водорастворимого белка в сырах, необходимо проводить измерения на выборке сыров, произведенных по одинаковому технологическому процессу, имеющих одинаковую специфику протеолиза и мало отличающийся между образцами внутри выборки коэффициент поглощения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Lei, T., Sun, D.-W. (2019). Developments of nondestructive techniques for evaluating quality attributes of cheeses: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 527–542. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.013>
- Chen, Y., MacNaughtan, W., Jones, P., Yang, Q., Williams, H., Foster, T. (2021). Selection of potential molecular markers for cheese ripening and quality prediction by NMR spectroscopy. *LWT*, 136, Article 110306. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110306>
- Kraggerud, H., Næs, T., Abrahamsen, R. K. (2014). Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. *International Dairy Journal*, 34(1), 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.008>
- Parrini, S., Crovetto, A., Aquilani, C., Nannucci, L., Bozzi, R. (2020). Near-infrared spectroscopy to assess chemical composition of sheep and goat cheeses. *Acta Fytotechnica Et Zootechnica*, 23, 97–104. <https://doi.org/10.15414/afz.2020.23.mi-fpap.97-104>
- Ayvas, H., Mortas, M., Dogan, M. A., Atan, M., Yildiz Tiryaki, G., Karagul Yuceer, Y. (2020). Near- and mid-infrared determination of some quality parameters of cheese manufactured from the mixture of different milk species. *Journal of Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04861-0>
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Singh, T.K. (1995). Methods for assessing proteolysis in cheese during ripening, Chapter in a book: *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. New York: Plenum Publishing Corp. 1995. ISBN 978-1-4615-1913-3
- Bansal, N., Piraino, P., McSweeney, P.L.H. (2010). Determination of Proteolysis in Cheese. Chapter in a book: *Handbook of Dairy Foods Analysis*, Boca Raton: CRC Press. 2010. ISBN 978-1-4200-4631-1
- Гудков А. В. Сыроделие: технологические, биологические и физико-химические аспекты. М.: ДеЛи принт. — 2004. — 804 с. ISBN 5-94343-071-7
- Nielsen, S.S. (2017). *Food Analysis*. Springer. 2017. ISBN978-3-319-45776-5
- Tremblay, L., Laporte, M.F., Leonil, J., Dupont, D., Paquin, P. (2003). Quantitation of proteins in milk and milk products. Chapter in a book: *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins*. Springer Science & Business Media. 2005. ISBN978-1-4419-8602-3
- Wallace, J.M., Fox, P.F. (1998). Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food Chemistry*, 62(2), 217–224. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00162-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00162-3)
- Myagkonosov, D.S., Abramov, D.V., Ovchinnikova, E.G., Krayushkina, V.N. (2020). Express Method for Assessing Proteolysis in Cheese and Aromatic Additives with Cheese Flavor. *Food Systems*, 3(4), 4–10. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-3-4-4-10>
- Samples, D. R., Richter, R. L., Dill, C. W. (1984). Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries: Comparison of Hull and trinitrobenzene sulfonic acid procedures. *Journal of Dairy Science*, 67(1), 60–63. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81266-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81266-7)
- Olson, B. J., Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science / Editorial Board*, John E. Coligan at al. Chapter 3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48>
- Hortin, G.L., Meilinger, B. (2005). Cross-Reactivity of Amino Acids and Other Compounds in the Biuret Reaction: Interference with Urinary Peptide Measurements. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1411–1419. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.052019>
- Georgi, G., Sawatzki, G. (1988). Molecular Weight Determination of Protein Hydrolysates (FPLC). Chapter in a book: *Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects*. Darmstadt: Steinkopff; New York: Springer. 1988. ISBN 13: 978-3-642-85375-3
- Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of protein. Chapter in a book: *Methods in Enzymology*. Vol. 182. Guide to Protein Purification. Academic Press, Inc. 1990. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)

18. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4(11), 2411–2423. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>

19. Silvestre, M.P.C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 60(2), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00347-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00347-0)

20. Silvestre, M.P.C., Dauphin, C., Hamon, M. (1993). Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Analytica Chimica Acta*, 282(3), 603–612. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80125-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80125-5)

21. Vakaleris, D. G., Price, W. V. (1959). A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 42(2), 264–276. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(59\)90562-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(59)90562-4)

22. Schroeder, C. L., Bodyfelt, F. W., Wyatt, C. J., McDaniel, M. R. (1988). Reduction of sodium chloride in cheddar cheese: Effect on sensory, microbiological, and chemical properties. *Journal of Dairy Science*, 71(8), 2010–2020. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79776-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79776-3)

23. Lin, Y. C., Washam, C. J., Vedamuthu, E. R. (1982). Vakaleris-Price and Hull methods for determining soluble tyrosine and tryptophan in blue cheese. *Journal of Dairy Science*, 65(5), 707–711. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82258-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82258-3)

24. Ivens, K. O., Baumert, J. L., Hutkins, R. L., Taylor, S. L. (2017). Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1629–1639. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11649>

25. Visser, S., Slangen, C. J., Robben, A. J. P. M. (1992). Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 599(1–2), 205–209. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85474-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85474-8)

26. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, 77(1), 41–76. <https://doi.org/10.1051/lait:199713>

27. Kirschenbaum, D. M. (1982). Molar absorptivity and values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. XXII. *Applied Biochemistry and Biotechnology: Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, 7(6), 475–495. <https://doi.org/10.1007/BF02799179>

REFERENCES

1. Lei, T., Sun, D. -W. (2019). Developments of nondestructive techniques for evaluating quality attributes of cheeses: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 527–542.

2. Chen, Y., MacNaughtan, W., Jones, P., Yang, Q., Williams, H., Foster, T. (2021). Selection of potential molecular markers for cheese ripening and quality prediction by NMR spectroscopy. *LWT*, 136, Article 110306. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110306>

3. Kraggerud, H., Næs, T., Abrahamson, R. K. (2014). Prediction of sensory quality of cheese during ripening from chemical and spectroscopy measurements. *International Dairy Journal*, 34(1), 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.07.008>

4. Parrini, S., Crovetto, A., Aquilani, C., Nannucci, L., Bozzi, R. (2020). Near-infrared spectroscopy to assess chemical composition of sheep and goat cheeses. *Acta Fytotechnica Et Zootechnica*, 23, 97–104. <https://doi.org/10.15414/afz.2020.23.mi-fpap.97-104>

5. Ayvaz, H., Mortas, M., Dogan, M. A., Atan, M., Yildiz Tiryaki, G., Karagul Yuceer, Y. (2020). Near- and mid-infrared determination of some quality parameters of cheese manufactured from the mixture of different milk species. *Journal of Food Science and Technology*, <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04861-0>

6. Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Singh, T.K. (1995). Methods for assessing proteolysis in cheese during ripening, Chapter in a book: *Chemistry of Structure-Function Relationships in Cheese*. New York: Plenum Publishing Corp. 1995. ISBN 978-1-4615-1913-3

7. Bansal, N., Piraino, P., McSweeney, P.L.H. (2010). Determination of Proteolysis in Cheese. Chapter in a book: *Handbook of Dairy Foods Analysis*, Boca Raton: CRC Press. 2010. ISBN 978-1-4200-4631-1

8. Gudkov, A. V. (2004). Cheesemaking: Technological, biological and physical-chemical aspects. Moscow: DeLi print. – 804 p. ISBN 5-94343-071-7 (in Russian)

9. Nielsen, S.S. (2017). *Food Analysis*. Springer. 2017. ISBN 978-3-319-45776-5

10. Tremblay, L., Laporte, M.F., Leonil, J., Dupont, D., Paquin, P. (2003). Quantitation of proteins in milk and milk products. Chapter in a book: *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins*. Springer Science & Business Media. 2003. ISBN978-1-4419-8602-3

11. Wallace, J.M., Fox, P.F. (1998). Rapid spectrophotometric and fluorimetric methods for monitoring nitrogenous (proteinaceous) compounds in cheese and cheese fractions: a review. *Food Chemistry*, 62(2), 217–224. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00162-3](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00162-3)

12. Myagkonosov, D.S., Abramov, D.V., Ovchinnikova, E.G., Krayushkina, V.N. (2020). Express Method for Assessing Proteolysis in Cheese and Aromatic Additives with Cheese Flavor. *Food Systems*, 3(4), 4–10. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-3-4-4-10>

13. Samples, D. R., Richter, R. L., Dill, C. W. (1984). Measuring proteolysis in Cheddar cheese slurries: Comparison of Hull and trinitrobenzene sulfonic acid procedures. *Journal of Dairy Science*, 67(1), 60–63. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81266-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81266-7)

14. Olson, B. J., Markwell, J. (2007). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Protein Science* / Editorial Board, John E. Coligan at al. Chapter 3. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48>

15. Hortin, G.L., Meilinger, B. (2005). Cross-Reactivity of Amino Acids and Other Compounds in the Biuret Reaction: Interference with Urinary Peptide Measurements. *Clinical Chemistry*, 51(8), 1411–1419. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.052019>

16. Georgi, G., Sawatzki, G. (1988). Molecular Weight Determination of Protein Hydrolysates (FPLC). Chapter in a book: *Milk proteins: nutritional, clinical, functional and technological aspects*. Darmstadt: Steinkopff; New York: Springer. 1988. ISBN13: 978-3-642-85375-3

17. Stoscheck, C.M. (1990). Quantitation of protein. Chapter in a book: *Methods in Enzymology*. Vol. 182. Guide to Protein Purification. Academic Press, Inc. 1990. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82008-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82008-P)

18. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science*, 4(11), 2411–2423. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>

19. Silvestre, M.P.C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 60(2), 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00347-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00347-0)

20. Silvestre, M.P.C., Dauphin, C., Hamon, M. (1993). Application of UV absorption and second-derivative spectrophotometry for analysing casein hydrolysates. *Analytica Chimica Acta*, 282(3), 603–612. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)80125-5](https://doi.org/10.1016/0003-2670(93)80125-5)

21. Vakaleris, D. G., Price, W. V. (1959). A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *Journal of Dairy Science*, 42(2), 264–276. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(59\)90562-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(59)90562-4)

22. Schroeder, C. L., Bodyfelt, F. W., Wyatt, C. J., McDaniel, M. R. (1988). Reduction of sodium chloride in cheddar cheese: Effect on sensory, microbiological, and chemical properties. *Journal of Dairy Science*, 71(8), 2010–2020. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79776-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79776-3)

23. Lin, Y. C., Washam, C. J., Vedamuthu, E. R. (1982). Vakaleris-Price and Hull methods for determining soluble tyrosine and tryptophan in blue cheese. *Journal of Dairy Science*, 65(5), 707–711. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(82\)82258-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82258-3)

24. Ivens, K. O., Baumert, J. L., Hutkins, R. L., Taylor, S. L. (2017). Effect of proteolysis during Cheddar cheese aging on the detection of milk protein residues by ELISA. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 1629–1639. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11649>

25. Visser, S., Slangen, C. J., Robben, A. J. P. M. (1992). Determination of molecular mass distributions of whey protein hydrolysates by high-performance size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 599(1–2), 205–209. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(92\)85474-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(92)85474-8)

26. McSweeney, P. L. H., Fox, P. F. (1997). Chemical methods for the characterization of proteolysis in cheese during ripening. *Lait*, 77(1), 41–76. <https://doi.org/10.1051/lait:199713>

27. Kirschenbaum, D. M. (1982). Molar absorptivity and values for proteins at selected wavelengths of the ultraviolet and visible regions. XXII. *Applied Biochemistry and Biotechnology: Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, 7(6), 475–495. <https://doi.org/10.1007/BF02799179>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
<p>Мягконов Дмитрий Сергеевич — кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом прикладной биохимии и энзимологии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: + 7-915-973-63-13 E-mail: mds-mail@mail.ru https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * автор для контактов</p>	<p>Dmitry S. Myagkonosov — candidate of technical sciences, leading researcher, head of research department in applied biochemistry and enzymology, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking — Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Krasnoarmeysky Boulevard, 19 Tel. : + 7-915-973-63-13 E-mail: mds-mail@mail.ru https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * corresponding author</p>
<p>Абрамов Дмитрий Васильевич — кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель направления биохимических исследований по сыроделию и маслоделию Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: + 7-910-970-42-97 E-mail: uglich.dva@mail.ru https://orcid.org/0000-0001-8326-1932</p>	<p>Dmitry V. Abramov — candidate of biological sciences, leading researcher, head of biochemical research in cheesemaking and buttermaking, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking — Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Krasnoarmeysky Boulevard, 19 Tel.: + 7-910-970-42-97 E-mail: uglich.dva@mail.ru https://orcid.org/0000-0001-8326-1932</p>
<p>Овчинникова Елена Григорьевна — научный сотрудник, отдел биохимии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: + 7-48532-98-1-94, E-mail: elenna.ov@mail.ru https://orcid.org/0000-0003-4891-4330</p>	<p>Elena G. Ovchinnikova — researcher, department of biochemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking — Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Krasnoarmeysky Boulevard, 19. Tel.: + 7-48532-98-1-94, E-mail: elenna.ov@mail.ru https://orcid.org/0000-0003-4891-4330</p>
<p>Краюшкина Валентина Николаевна — младший научный сотрудник, отдел биохимии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия — филиал Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова РАН 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: + 7-48532-98-1-33 E-mail: uglich-cheese@mail.ru https://orcid.org/0000-0002-4904-6152</p>	<p>Valentina N. Krayushkina — junior researcher, department of biochemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking — Branch of V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Krasnoarmeysky Boulevard, 19 Тел.: + 7-48532-98-1-33 E-mail: uglich-cheese@mail.ru https://orcid.org/0000-0002-4904-6152</p>
<p>Критерии авторства Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат</p>	<p>Contribution Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism</p>
<p>Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов</p>	<p>Conflict of interest The authors declare no conflict of interest</p>
<p>Поступила 14.02.2021</p>	<p>Received 14.02.2021</p>
<p>Поступила после рецензирования 15.03.2021</p>	<p>Accepted in revised 15.03.2021</p>
<p>Принята в печать 25.03.2021</p>	<p>Accepted for publication 25.03.2021</p>