

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54>

Поступила 20.02.2022

Поступила после рецензирования 14.03.2022

Принята в печать 25.03.2022

© Мягконос Д. С., Абрамов Д. В., Делицкая И. Н., Овчинникова Е. Г., 2022



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

Научная статья

Open access

ПРОТЕОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МОЛОКОСВЕРТЫВАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Мягконос Д. С.*, Абрамов Д. В., Делицкая И. Н., Овчинникова Е. Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия, Углич, Ярославская область, Россия

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

молокосвертывающие ферменты, молокосвертывающая активность, протеолитическая активность

АННОТАЦИЯ

Был исследован показатель соотношения молокосвертывающей (МСА) и протеолитической (ПА) активности для молокосвертывающих ферментных препаратов (МФП) на основе рекомбинантного химозина, животного происхождения и микробного происхождения. Величина МСА была измерена в единицах IMCU (International Milk-Clotting Units), величина ПА определялась методом Ансона на субстрате из гемоглобина при 30 °C и pH 5,3. Установлено, что наибольшим уровнем МСА/ПА обладали рекомбинантные химозины: группа с МСА/ПА < ~1000 включает МФП Chy-max® Extra 2235 Powder, Chy-max® Extra 600 Liquid и Renifer® 1800; группа с ~1000 < МСА/ПА < 1400 включает Chy-max® M 1000, Maxiren® 1800 и Chy-max® Extra 2235 Powder; группа с МСА/ПА > 3500 включает МФП Chy-max® Supreme 1000. МФП животного происхождения имели более низкий в сравнении с рекомбинантными химозинами показатель МСА/ПА, который для разных марок МФП с разным соотношением (% химозина / % пепсина) составил: Naturen® Extra 220 (95/5) = 199,7 ± 8,0; СФ «Экстра» (90/10) = 122,1 ± 1,9; Kalase® 150 (80/20) = 115,1 ± 0,7; Naturen® Stamix (50/50) = 86,2 ± 0,2; ФС 10 «Пепсин говяжий» (10/90) = 38,7 ± 1,8. МФП микробного происхождения имели самый низкий уровень МСА/ПА среди трех типов изученных МФП. МСА/ПА для разных марок МФП микробного происхождения: Meito® Microbial Rennet = 36,35 ± 0,48; Marzyme® 2200 MT = 31,03 ± 0,13; Fromase® 2200 TL = 18,57 ± 0,13; Fromase® 750 XLG = 16,06 ± 0,49.

ФИНАНСИРОВАНИЕ: Статья подготовлена в рамках выполнения исследований по государственному заданию № FNEN-2019-0010 Федерального научного центра пищевых систем им. В. М. Горбатова Российской академии наук.

Received 20.02.2022

Accepted in revised 14.03.2022

Accepted for publication 25.03.2022

© Myagkonosov D. S., Abramov D. V., Delitskaya I. N., Ovchinnikova E. G., 2022

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

Original scientific article

Open access

PROTEOLYTIC ACTIVITY OF MILK-CLOTTING ENZYMES OF DIFFERENT ORIGIN

Dmitriy S. Myagkonosov*, Dmitriy V. Abramov, Irina N. Delitskaya, Elena G. Ovchinnikova

All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking, Uglich, Yaroslavl Region, Russia

KEY WORDS:

milk-clotting enzymes, milk-clotting activity, proteolytic activity

ABSTRACT

The ratio of the milk-clotting activity (MCA) and proteolytic activity (PA) was compared for milk-clotting enzyme preparations (MEP) based on recombinant chymosin, chymosin of animal origin and microbial origin. The MCA value was measured in the international milk-clotting units (IMCU), the PA value was determined by the Anson method on the substrate from hemoglobin at 30 °C and pH 5.3. It was found that recombinant chymosins had the highest level of MCA/PA: the group with MCA/PA < ~1000 includes MEPs Chy-max® Extra 2235 Powder, Chy-max® Extra 600 Liquid and Renifer® 1800; the group with ~1000 < MCA/PA < 1400 includes Chy-max® M 1000, Maxiren® 1800 and Chy-max® Extra 2235 Powder; the group with MCA/PA > 3500 includes MEP Chy-max® Supreme 1000. MEPs of animal origin had a lower indicator of MCA/PA compared to recombinant chymosins, which for different trademarks of MEPs with different ratios of %chymosin to %pepsin was equal to: Naturen® Extra 220 (95/5) = 199.7 ± 8.0; rennet SF "Extra" (90/10) = 122.1 ± 1.9; Kalase® 150 (80/20) = 115.1 ± 0.7; Naturen® Stamix (50/50) = 86.2 ± 0.2; rennet FS10 "Bovine pepsin" (10/90) = 38.7 ± 1.8. MEP of microbial origin had the lowest level of MCA/PA among all three types of MEPs under study. MCA/PA for different trademarks of MEPs of microbial origin was as follows: Meito® Microbial Rennet = 36.35 ± 0.48; Marzyme® 2200 MT = 31.03 ± 0.13; Fromase® 2200 TL = 18.57 ± 0.13; Fromase® 750 XLG = 16.06 ± 0.49.

FUNDING: The article was published as part of the research topic No. FNEN-2019-0010 of the state assignment of the V. M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS.

1. Введение

Молокосвертывающий фермент (МФ) является важным функционально-необходимым компонентом, который применяется для производства большинства групп сыров. Основная задача МФ — свертывание молока с образованием сгустка,

способного отдавать влагу. Действие МФ продолжается также после свертывания, как на стадии обработки сгустка в сыродельной ванне, так и на этапе созревания и хранения сыра.

Протеолитическая активность МФ выражается в двух формах. Первая — это специфическая молокосвертывающая

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Мягконос Д. С., Абрамов Д. В., Делицкая И. Н., Овчинникова, Е. Г. (2022). Протеолитическая активность молокосвертывающих ферментов разного происхождения. *Пищевые системы*, 5(1), 47-54. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54>

FOR CITATION: Myagkonosov, D. S., Abramov, D. V., Delitskaya, I. N., Ovchinnikova, E. G. (2022). Proteolytic activity of milk-clotting enzymes of different origin. *Food systems*, 5(1), 47-54. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-1-47-54>

активность (МСА), равная степени протеолиза в отношении расщепления связи Phe105-Met106 в молекуле каппа-казеина. МСА измеряется в единицах IMCU (International Milk-Clotting Units). Вторая форма — общая протеолитическая активность (ПА), равная степени неспецифического протеолиза в отношении расщепления любых пептидных связей в казеинах молока [1].

При производстве сыров следует ориентироваться на протеолитические свойства МФ, т. к. кроме активности на этапе свертывания молока, МФ, перешедший из молока в состав сыра, проявляет свою активность на стадии созревания и хранения. Поскольку при свертывании молока МФ вносят в пересчете на единицы МСА, критерием оценки неспецифической ПА фермента является не абсолютная величина ПА, а ее доля от МСА. Критерием, определяющим пригодность фермента для свертывания молока в сыроделии, является соотношение его молокосвертывающей активности (МСА) к общей протеолитической активности (ПА). Соотношение МСА/ПА выражает долю «полезной» активности фермента [2]. Повышение соотношения МСА/ПА у МФП дает следующие выгоды при производстве сыра:

- ❑ обеспечивается стабильно высокая скорость свертывания молока;
- ❑ повышается выход сыра (на 0,5–1,5%);
- ❑ устраняются пороки сыра, связанные с избыточным протеолизом (горький вкус);
- ❑ увеличивается срок хранения сыра.

В настоящее время не существует единой методики для оценки ПА МФ. В общем случае ПА МФ оценивается методом Ансона на субстрате из казеина по количеству остатков ароматических аминокислот (триптофан и тирозин), образующихся исследуемым МФ в единицу времени. Однако условия проведения измерений (рН, температура, время реакции и ионная сила раствора) у разных исследователей часто отличаются [3].

В частности, известно об использовании метода Ансона для оценки общей протеолитической активности МФ во множестве разных модификаций, в т. ч.:

- ❑ на субстрате из казеина в фосфатном буфере при величине рН 7,0 и температуре $t = 55^\circ\text{C}$, с оценкой количества пептидов, растворимых в 3,3%-м растворе ТХУ [4];
- ❑ на субстрате из казеина в фосфатном буфере при величине рН 6,5 и температуре $t = 37^\circ\text{C}$ с оценкой количества пептидов, растворимых в 6%-м растворе ТХУ [5];
- ❑ на субстрате из восстановленного сухого молока при величине рН 6,5 и температуре $t = 32^\circ\text{C}$ с оценкой количества пептидов, растворимых в 12%-м растворе ТХУ [6];
- ❑ на субстрате из казеина в фосфатном буфере при величине рН 6,3 и температуре $t = 55^\circ\text{C}$ с оценкой количества пептидов, растворимых в 3,3%-м растворе ТХУ [7];
- ❑ на субстрате из казеина в фосфатном буфере при величине рН 5,8 и температуре $t = 45^\circ\text{C}$, с оценкой количества пептидов, растворимых в смеси из 0,8% ТХУ + 0,9% уксусной кислоты + 0,82% ацетата натрия [8];
- ❑ на субстрате из казеина при величине рН 5,5 и температуре $t = 30^\circ\text{C}$, с оценкой количества пептидов, растворимых в 2,5%-м растворе ТХУ [9];
- ❑ на субстрате из казеина в ацетатном буфере при величине рН 5,2 и температуре $t = 37^\circ\text{C}$, с оценкой количества пептидов, растворимых в 7,5%-м растворе ТХУ [10];
- ❑ на субстрате из гемоглобина при величине рН 4,0 и температуре $t = 37^\circ\text{C}$, с оценкой количества пептидов, растворимых в 3,1%-м растворе ТХУ [11];
- ❑ на субстрате из казеина в 0,1 М глицин-HCl буфере при величине рН 3,0 и температуре $t = 35^\circ\text{C}$, с оценкой количества пептидов, растворимых в 4,1%-м растворе ТХУ [12].

На основании анализа литературных источников для оценки ПА МФ была выбрана модификация метода Ансона по прописи, содержащейся в ГОСТ 34430–2018¹. В указанной методике гидролиз испытуемым ферментом проводят на субстрате из гемоглобина при величине рН 5,3 и температуре $t = 30^\circ\text{C}$, с оценкой количества пептидов, растворимых в 2,5%-м растворе ТХУ. Достоинством выбранной модификации является сочетание факторов (субстрат, температура, рН, концентрация раствора ТХУ), позволяющее получить наиболее сравнимые показатели ПА для МФ разного происхождения (животного, микробного происхождения и рекомбинантного типа). Целью проведенных исследований было установление показателя удельной протеолитической активности, оцениваемой по показателю МСА/ПА, для молокосвертывающих ферментов разного состава от разных производителей, что необходимо для объективного сравнения данных МФ по уровню неспецифической ПА.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

Исследовали молокосвертывающие ферментные препараты (МФП) следующих марок:

Chy-max® Powder Extra 2235 NB, Chy-max® Supreme 1000, Chy-max® M 1000, Chy-max® Extra 600 Liquid, Naturen® Extra 220 NB, Naturen® Stamix 1150 (производитель Chr. Hansen A/S, Дания); Fromase® 2200 TL, Fromase® 750 XLG, Maxiren® 1800 (производитель DSM Food Specialties, Франция); Marzyme® 2200 MT (производитель Danisco France SAS, Франция); Meito® Microbial Rennet (производитель Meito Sangyo Co., LTD, Япония); Kalase® 150 (производитель CSK Food Enrichment B. V., Нидерланды); ФС 90 «Экстра», ФС 10 «Пепсин говяжий» (производитель ООО «Завод эндокринных ферментов», Россия); Renifer® 1800 (производитель PROQUIGA BIOTECH, SA, Испания).

Для определения протеолитической активности МФП использовали реактивы: гемоглобин из бычьей крови (производитель Sigma, США), трихлоруксусная кислота (х. ч.), L-тирозин с содержанием основного вещества $\geq 98\%$ («ХИММЕД», Россия), реактив Фолина-Чикелтау («Ленреактив», Россия).

2.2 Методы

2.2.1. Методы исследования свойств молокосвертывающих ферментов

Определение общей протеолитической активности проводилось методом Ансона на субстрате из гемоглобина, в прописи метода по ГОСТ 34430–2018², применительно к слабым кислотам протеазам (при рН 5,3).

2.2.2. Методы статистического анализа

Математическая обработка данных проводилась с применением программных пакетов Microsoft Excel и Statsoft Statistica (v.5.5). Экспериментальные данные были проанализированы при помощи однофакторного дисперсионного анализа с использованием процедуры парного сравнения Tukey при уровне статистической значимости $p = 0,05$ [13].

Определение протеолитической активности МФ проводили в двух повторностях.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Молокосвертывающая и протеолитическая активность МФ разного происхождения

На основании данных, по уровню МСА и ПА исследованных марок МФ разного происхождения были рассчита-

¹ ГОСТ 34430–2018 Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения протеолитической активности. М.: Стандартинформ, 2018. — 12 с.

² Там же.

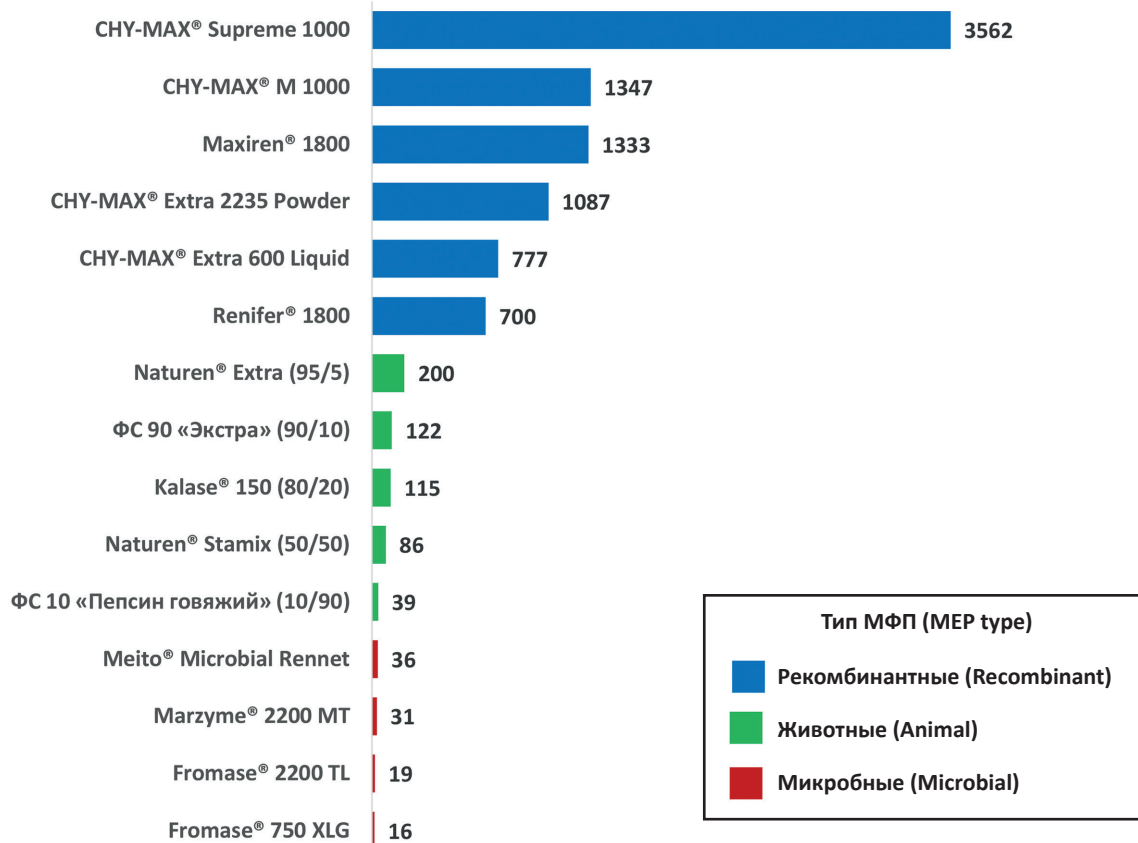


Рисунок 1. Соотношение МСА/ПА у МФП разного происхождения
Figure 1. MCA/PA ratio in MEPs of different origin

ны значения показателя МСА/ПА. Полученные результаты представлены на Рисунке 1.

Полученные в результате исследований данные по соотношению МСА/ПА для МФ разного происхождения совпадают с результатами оценки МСА/ПА, приводимыми фирмой Chr. Hansen A/S для МФП собственного производства [14].

На основании полученных данных, приведенных на Рисунке 1, видно, что МФ разного происхождения (животного, микробного происхождения или рекомбинантного типа) значительно отличаются по величине показателя МСА/ПА. Статистические показатели по уровню МСА/ПА для МФ разного типа представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Средние показатели МСА/ПА для МФ разного происхождения

Table 1. Mean values of MCA/PA for MEs of different origin

Тип МФ	Среднее соотношение МСА/ПА для МФ одного типа, IMCU/ед. ПА		
	Среднее	СКО	КоэффВар
Рекомбинантные	1468	1061	72%
Животные	112	59	52%
Микробные	26	10	38%

Примечание:

Среднее — среднее значение по выборке;

СКО — среднее квадратичное отклонение;

КоэффВар — коэффициент вариации (КоэффВар = СКО/Среднее).

Высокие значения коэффициента вариации (> 30%) свидетельствуют о существенных различиях по МСА/ПА между разными марками МФ одинакового типа (см. Таблицу 1). Для получения подробной характеристики о протеолитических свойствах разных марок МФ была проведена дополнительная статистическая обработка.

3.2 Молокоосвертывающая и протеолитическая активность рекомбинантных МФ

Результаты оценки удельной протеолитической активности МФ на основе рекомбинантных химозинов приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Показатели МСА и ПА для рекомбинантных МФП
Table 2. MCA and PA values for recombinant MEPs

Марка МФП	Состав	Молокоосвертывающая активность (МА), номинальная, IMCU/г	Протеолитическая активность (ПА), ед. ПА/г	Соотношение МСА/ПА, IMCU/ед. ПА
Chy-max® Supreme 1000	Модифицированный химозин верблюда	912 *	0,26 ± 0,01	3562 ± 42 ^a
Chy-max® M 1000	Химозин верблюда	904 *	0,68 ± 0,09	1347 ± 179 ^b
Maxiren® 1800	Химозин теленка (вар. Б)	1800	1,36 ± 0,13	1333 ± 130 ^b
Chy-max® Extra 2235 Powder	Химозин теленка (вар. Б)	2235	2,06 ± 0,14	1087 ± 76 ^{bc}
Chy-max® Extra 600 Liquid	Химозин теленка (вар. Б)	554 *	0,71 ± 0,01	777 ± 3 ^c
Renifer® 1800	Химозин **	1800	2,59 ± 0,30	700 ± 81 ^c

Примечание:

Данные приведены в форме «среднее значение ± стандартное отклонение» (n = 2).

^{a, b, c} данные внутри одного столбца, не имеющие одинаковых символов в надстрочных обозначениях, обладают статистически достоверными отличиями (p < 0,05, парное сравнение средних значений при помощи теста Tukey).

* Молокоосвертывающая активность МФП в жидкой форме выпуска пересчитана из номинальной активности в 1 см³ на номинальную активность в 1 г, исходя из измеренной плотности данных препаратов: Chy-max Extra 600 Liquid — 1,083 г/см³, Chy-max M 1000 — 1,107 г/см³, Chy-max Supreme — 1,096 г/см³.

** Тип химозина, содержащегося в препарате Renifer® 1800, неизвестен.

Сравнение средних значений МСА/ПА для МФП с помощью теста парных сравнений Tukey позволило установить, что исследованные МФП рекомбинантного типа подразделяются на три группы, статистически достоверно ($p < 0,05$) отличающиеся между собой по соотношению МСА/ПА:

- 1 группа (МСА/ПА $< \sim 1000$) включает Chy-max® Extra 2235 Powder, Chy-max® Extra 600 Liquid и Renifer® 1800;
- 2 группа ($\sim 1000 < \text{МСА/ПА} < 1400$) включает Chy-max® M 1000, Maxiren® 1800 и Chy-max® Extra 2235 Powder;
- 3 группа (МСА/ПА > 3500) включает единственный образец — Chy-max® Supreme 1000.

Главным фактором, определяющим показатель МСА/ПА для МФП, является содержащийся в нем вид фермента. МФП марок Maxiren и Chy-max Extra содержат в своем составе рекомбинантный химозин теленка генетического варианта Б (вероятно, так же и МФП Renifer, происхождение химозина в составе которого производителем не указано [15]). Рекомбинантные МФП на основе химозина теленка относятся к т. н. первому поколению рекомбинантных МФП [16]. Их массовый выпуск и использование были начаты с начала 1990-х годов, поэтому данные МФП среди прочих рекомбинантных химозинозидов отличаются наиболее низким показателем МСА/ПА.

Химозин верблюда, из которого состоит МФП Chy-max M, обладает большей специфичностью к каппа-казеину и вследствие этого большим показателем МСА/ПА, чем химозин теленка [3,17].

МФП Chy-max Supreme (Chr. Hansen A/S) содержит в своем составе уникальный фермент — химозин верблюда с модифицированной искусственным образом аминокислотной последовательностью. Данный фермент имеет повышенную специфичность в отношении каппа-казеина, большую, чем у химозина верблюда. Поэтому показатель МСА/ПА МФП Chy-max Supreme существенно выше, чем у всех прочих марок МФП рекомбинантного типа [18].

Полученные данные по МСА/ПА для разных типов рекомбинантных МФП несколько отличаются от данных, приводимых в научной литературе. Отсутствие статистически достоверных отличий по показателю МСА/ПА между МФП Chy-max M (химозин верблюда) и МФП Maxiren (химозин теленка вариант В) [16] вызывает вопросы, т. к. уровень ПА химозина теленка существенно выше, чем ПА химозина верблюда: в 7 раз, по данным Karreler et al [17], и в 2 раза, по данным, представленным компанией Chr. Hansen [14]. Также в результате наших исследований были получены различия по величине МСА/ПА для МФП Maxiren и МФП Chy-max Extra, которые формально имеют идентичный состав — рекомбинантный химозин теленка генетического варианта Б.

Причинами, влияющими на уровень МСА/ПА ферментных препаратов разных торговых марок, формально обладающих одинаковым составом, являются отличия в технологии производства данных МФП.

Компания Chr. Hansen A/S для изготовления МФП с торговой маркой Chy-max использует рекомбинантный штамм мицелиарного гриба *Aspergillus niger* var. *awamori*. Компания DSM Food Specialties получает МФП Maxiren с применением рекомбинантного штамма дрожжей *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*. Гриб *Aspergillus niger* выделяет наряду с целевым ферментом (химозином) большое количество белковых веществ, в т. ч. ферментов [16,19]. Получаемая от гриба *Aspergillus niger* ферментная смесь, содержащая химозин, требует тщательной очистки, в процессе которой клетки гриба удаляются центрифугированием и фильтрацией, а полученный фильтрат очищается с помощью хроматографии, концентрируется ультрафильтрацией и лиофильно высушивается [16,20]. В сравнении с *Aspergillus niger* дрожжи

Kluyveromyces marxianus продуцируют существенно меньшее количество примесных белков. Процесс очистки рекомбинантного химозина, выделяемого *Kluyveromyces marxianus*, включает прекращение ферментации путем добавления бензоата, подкисление экстракта до pH 2 за счет добавления серной кислоты, что приводит к активации прохимозина и инактивации иных протеаз, содержащихся в экстракте, фильтрацию для отделения дрожжевых клеток и концентрирование ферментного экстракта ультрафильтрацией [21].

В связи с тем, что при глубокой очистке часть фермента теряется в непрофильтрованном остатке, а часть инактивируется [22], в промышленности практикуется минимально-необходимая степень очистки. Чаще всего очистка массово выпускаемых ферментных препаратов ограничивается стадией ультрафильтрации. Только при особых требованиях к чистоте ферментного препарата используются дополнительные стадии очистки (ионообменная хроматография и гель-фильтрация) [23]. Представленные на рынке МФП Chy-max (Chr. Hansen A/S) и Maxiren (DSM Food Specialties SAS) выпускаются в разных градациях очистки [24]. Исследования состава рекомбинантных МФП торговой марки Chy-max методами жидкостной хроматографии и гель-электрофореза показали, что препарат Chy-max Extra в сухой форме выпуска имел меньшее количество примесей, чем препараты Chy-max M и Chy-max Plus в жидкой форме выпуска [25].

Указанные различия в используемых микроорганизмах-продуцентах, а также в технологии производства, имеют следствия в более высоком показателе МСА/ПА у МФ Maxiren® 1800 (сухая форма выпуска), чем у МФ Chy-max® Extra 2235 Powder (сухая форма выпуска) и Chy-max® Extra 600 Liquid (жидкая форма выпуска).

3.2 Молоковертывающая и протеолитическая активность МФ животного происхождения

Статистические данные по уровню протеолитической активности МФ животного происхождения приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Показатели МСА и ПА для МФП животного происхождения

Table 3. MCA and PA values for MEPs of animal origin

Марка МФП*	Молоковертывающая активность (МА), номинальная, IMCU/г	Протеолитическая активность (ПА), ед. ПА/г	Соотношение МСА/ПА, IMCU/ед. ПА
Naturen® Extra 220 (95/5)	193 **	0,97±0,04	199,7±8,0 ^a
ФС 90 «Экстра» (90/10)	768 ***	6,29±0,10	122,1±1,9 ^b
Kalase® 150 (80/20)	136 **	1,18±0,01	115,1±0,7 ^b
Naturen® Stamix (50/50)	1150	13,34±0,03	86,2±0,2 ^c
ФС 10 «Пепсин говяжий» (10/90)	624 ***	16,14±0,73	38,7±1,8 ^d

Примечание:

Данные приведены в форме «среднее значение ± стандартное отклонение» ($n = 2$).

^{a, b, c} данные внутри одного столбца, не имеющие одинаковых символов в надстрочных обозначениях, обладают статистически достоверными отличиями ($p < 0,05$, парное сравнение средних значений при помощи теста Tukey).

* В скобках указан состав препарата в форме «доля химозина, % / доля пепсина, %».

** Молоковертывающая активность МФП в жидкой форме выпуска пересчитана из номинальной активности в 1 см³ на номинальную активность в 1 г, исходя из измеренной плотности данных препаратов: Naturen® Extra 220–1,134 г/см³, Kalase® 150–1,103 г/см³.

*** Приведена фактическая молоковертывающая активность, определенная по ГОСТ ISO 11815.

Из данных, приведенных в Таблице 3, следует, что МФП животного происхождения на основе природного химозина телянка характеризуются существенно более низким соотношением МСА/ПА в сравнении с МФП на основе рекомбинантного химозина телянка (см. Таблицу 2).

Анализ приведенных в Таблице 3 данных методом парных сравнений Tukey показал, что исследованные МФП животного происхождения достоверно отличались ($p < 0,05$) по уровню МСА/ПА (кроме МФ марок СФ «Экстра» и Kalase® 150). Данный факт объясняется тем, что уровень протеолитической активности у МФ животного происхождения, а следовательно, и соотношение МСА/ПА у МФ животного происхождения зависят от содержания пепсина в ферментном препарате. Наряду с химозином (ЕС3.4.23.4), в препаратах СФ содержатся пепсины — пепсин А (ЕС3.4.23.1) и пепсин С (или гастринсин (ЕС3.4.23.3)), которые обладают существенно более высокой ПА в сравнении с химозином. Пепсины имеют меньшую удельную МСА (ед. МСА/г) и более высокую ПА (ед. ПА/г), чем химозин. Поэтому при линейном увеличении доли пепсина в препарате удельная ПА препарата (соотношение ПА/МСА) возрастает в геометрической прогрессии [19]. Установленная в результате наших исследований зависимость удельной ПА (ПА/МСА) МФП животного происхождения от содержания пепсина в составе препарата приведена на Рисунке 2.

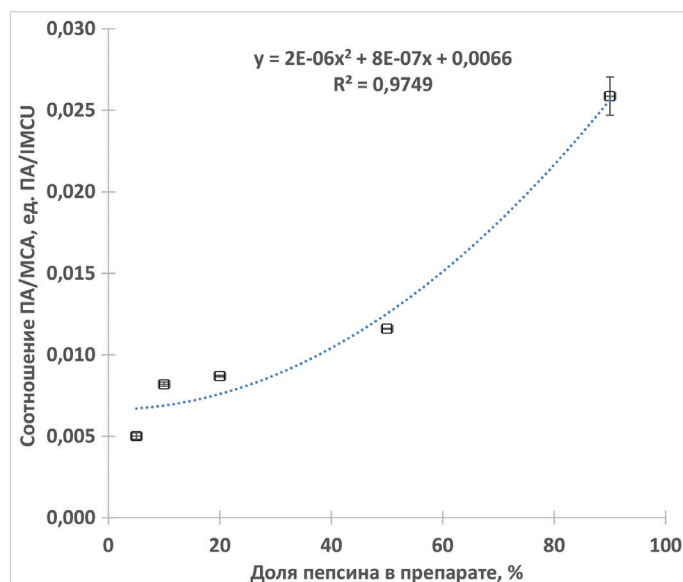


Рисунок 2. Зависимость удельной ПА (ПА/МСА) МФП животного происхождения от содержания пепсина в составе препарата

Figure 2. Dependence of the specific PA (PA/MCA) of MEPs of animal origin on the pepsin content in the composition of a preparation

Однако только лишь наличием пепсина в составе препаратов животного происхождения нельзя объяснить значительное отличие по протеолитической специфичности между МФП на основе телячьего химозина из природных источников и рекомбинантными МФП на основе телячьего химозина. Так, МФП Naturen® Extra, который состоит более чем на 95% из химозина, имеет соотношение МСА/ПА в ~5 раз более низкое, чем препарат Chu-max® Extra.

Кроме химозина В препараты сычужного фермента содержат значительное количество химозинов генетических вариантов А и С, которые обладают повышенным уровнем МСА в сравнении с химозином В [19,26]. В результате хроматографических исследований состава МФП было установлено, что в препаратах сычужного фермента торговых марок BioRen, Carlina и Naturen, номинально содержащих свыше 80% химозина, было обнаружено только ~50–60%

химозина В, а препараты рекомбинантного химозина (Chu-max Extra и Maxiren) на 100% состояли из химозина телянка генетического варианта В [6]. Можно предположить, что химозины А и С обладают более высокой протеолитической активностью, чем химозин В, что и является причиной более высокого уровня неспецифической ПА у МФП животного происхождения.

3.3 Молокозвертывающая и протеолитическая активность МФ микробного происхождения

Статистические данные по уровню протеолитической активности МФ микробного происхождения приведены в Таблице 4.

Таблица 4. Показатели МСА и ПА для МФП микробного происхождения

Table 4. MCA and PA values for MEPs of microbial origin

Марка МФП	Молокозвертывающая активность (МА), номинальная, IMCU/г	Протеолитическая активность (ПА), ед. ПА/г	Соотношение МСА/ПА, IMCU/ед. ПА
Meito® Microbial Rennet	3000	82,53 ± 1,08	36,35 ± 0,48 ^a
Marzyme® 2200 MT	2200	70,90 ± 0,30	31,03 ± 0,13 ^b
Fromase® 2200 TL	2200	118,48 ± 0,83	18,57 ± 0,13 ^c
Fromase® 750 XLG	636 *	39,61 ± 1,21	16,06 ± 0,49 ^d

Примечание:

Данные приведены в форме «среднее значение ± стандартное отклонение» ($n = 2$).

^{a, b, c} данные внутри одного столбца, не имеющие одинаковых символов в надстрочных обозначениях, обладают статистически достоверными отличиями ($p < 0,05$, парное сравнение средних значений при помощи теста Tukey).

* Молокозвертывающая активность МФП в жидкой форме выпуска пересчитана из номинальной активности в 1 см³ на номинальную активность в 1 г, исходя из измеренной плотности данных препаратов: для Fromase® 750 XLG плотность равна 1,180 г/см³.

Анализ приведенных в Таблице 4 данных методом парных сравнений Tukey показывает, что МФ микробного происхождения изученных марок статистически достоверно различаются между собой по величине МСА/ПА. Причиной полученных различий между исследованными МФ микробного происхождения является разница в используемых штаммах-продуцентах и технологии очистки. При производстве исследованных марок МФ микробного происхождения их производителями было применено три разных подхода для снижения ПА и повышения соотношения МСА/ПА.

В случае МФП Fromase (DSM Food Specialties) для повышения показателя МСА/ПА была применена многоступенчатая очистка от посторонних примесей протеазы гриба *Rhizomucor miehei*, полученного из природного источника методом селекции [3]. Молокозвертывающая протеаза гриба *R. miehei* (ЕС3.4.23.23) обладает существенным недостатком — повышенной термостабильностью, что приводит к сохранению ее активности в молочной сыворотке с последующим протеолизом белков сыворотки. Для снижения термостабильности протеазы *R. miehei* используется ее окислительная модификация [27,28]. Однако подобное воздействие приводит не только к снижению термостабильности протеазы *R. miehei*, но и к уменьшению ее показателя МСА/ПА [29]. Вероятно, вследствие этого, более термостабильный МФП марки Fromase® 2200 TL имеет больший показатель МСА/ПА в сравнении с менее термостабильным МФП марки Fromase® 750 XLG.

МФП Marzyme (Danisco France SAS) обладает большим уровнем МСА/ПА в сравнении с МФП марки Fromase. Для

достижения такого результата были использованы методы генной инженерии: генетическая информация, отвечающая за синтез протеазы, обладающей МСА, была взята от гриба *Rhizomucor miehei* и внедрена в генный код гриба *Aspergillus oryzae* [30]. Полученный рекомбинантный штамм гриба *A. oryzae* в сравнении с грибом *R. miehei* продуцирует существенно меньшее количество нежелательных примесей, что упрощает очистку фермента и позволяет получить МФ с более высоким показателем МСА/ПА [31].

МФП Meito® Microbial Rennet (Meito Sangyo Co., Ltd) имеет самый высокий показатель МСА/ПА среди исследованных МФП микробного происхождения. Для получения столь высокого показателя МСА/ПА производителем был использован целый ряд технологических приемов. В отличие от других исследованных МФП микробного происхождения, данный препарат состоит из смеси протеаз двух видов грибов: *Rhizomucor miehei* и *Rhizomucor pusillus* [32]. Включение в состав препарата термолабильной протеазы *R. pusillus* [33] позволило снизить степень термоустойчивости препарата без необходимости окислительной модификации протеазы *R. miehei*, приводящей к снижению ее показателя МСА/ПА. Была проведена предварительная селекция штаммов-продуцентов *R. miehei* и *R. pusillus*, а также оптимизированы условия культивирования (температура, pH и состав питательного субстрата) с целью получения максимального выхода целевого фермента и снижения количества загрязняющих примесей [20,28]. Дополнительно была применена окислительная модификация протеазы *R. pusillus*, приводящая к повышению ее показателя МСА/ПА [34].

Полученные данные по соотношению МСА/ПА, приведенные в Таблице 4, показывают, что микробные МФП марок Meito и Marzyme по протеолитической специфичности находятся примерно на уровне МФ животного происхождения с содержанием 10% химозина и 90% говяжьего пепсина, а МФ марки Fromase имеют еще больший уровень неспецифической ПА.

3.4 Влияние ПА МФ разного происхождения на процесс производства и качество сыров

Влияние показателя МСА/ПА МФП на процесс обработки стукта в сыродельной ванне и на динамику протеолиза в сырах было подтверждено исследованиями авторов данной статьи при испытаниях МФ разного происхождения в составе мягких [35], полутвердых сыров [36,37] и сыров с чеддеризацией и термомеханической обработкой сырной массы [38]. Было установлено, что при одинаковой дозе внесения МФ в сыродельную ванну, уровень МСА/ПА используемого МФ не оказывал статистически значимого влияния продолжительность стадий обработки зерна в ванне, физико-химические показатели получаемой сыворотки и свежих сыров. Различия в уровне МСА/ПА использованных МФ сказывались на стадии созревания и хранения сыров. Сыры произведенные с МФ имеющими высокий показатель МСА/ПА к концу срока созревания имели более плотную консистенцию, менее выраженный вкус и сохраняли свои кондиционные свойства на протяжении более длительного срока хранения, в сравнении с сырами, произведенными с МФ, имеющими низкий уровень МСА/ПА.

4. Заключение

Опираясь на полученные данные, можно сделать вывод, что показатель МСА/ПА у группы МФ на основе рекомбинантных химозинов в среднем в 13 раз выше, чем в группе МФ животного происхождения, а у МФ животного происхождения показатель МСА/ПА в среднем в 4 раза выше, чем у МФ микробного происхождения (см. Таблицу 1). Теоретически такая разница в удельной величине неспецифической ПА должна привести к получению отличий в физико-химических и органолептических показателях сыров, изготовленных с МФП разного типа, а также к различиям в динамике изменения данных показателей в процессе созревания и хранения сыров.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Langholm Jensen J., Mølgaard A., Navarro Poulsen J.-C., Harboe M. K., Simonsen J. B., Lorentzen A. M. et al. (2013). Camel and bovine chymosin: The relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallography*, 69(5), 901–913. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003260>
- Guinee, T. P., Wilkinson, M. G. (1992). Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of Society of Dairy Technology*, 45(4), 94–10. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1992.tb01791.x>
- Dekker, P. (2019). Dairy Enzymes. Chapter in a book: *Industrial Enzyme Applications*. (Ed. by Vogel A. and May O.), 1st Ed. — Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2019
- Abd El-Salam, B. A. E.-Y., Ibrahim, O. A. E.-H., El-Sayed, H. A. E.-R. (2017). Purification and characterization of milk clotting enzyme from artichoke (*Cynara cardunculus* L.) flowers as coagulant on white soft cheese. *International Journal of Dairy Science*, 12(4), 254–265. <https://doi.org/10.3923/ijds.2017.254.265>
- Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, A. K., Grover, S., Batish, V. K. (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology — B Biochemistry and Molecular Biology*, 145(1), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.06.010>
- Jacob, M. Milchgerinnungsenzyme verschiedener herkunft und ihr einfluss auf käseausbeute und käsequalität. Dissertation. Dresden: Technische Universität Dresden., 2011. Электронный ресурс: <http://d-nb.info/1067190643/34> Дата обращения 28.02.2022
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., Singh, S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1849–1859. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2197-z>
- Yuqiu, L., Tan, H., Da, L., Zhoulin, L., Yanping, C., Yuanyuan, J. et al. (2015). Screening and Characterization of a Mutant Fungal Aspartic Proteinase from *Mucor pusillus*. *The Open Biotechnology Journal*, 9, 119–126. <http://doi.org/10.2174/1874070701509010119>
- Shamtysan, M., Dmitriyeva, T., Kolesnikov, B., Denisova, N. (2014). Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *LWT — Food Science and Technology*, 58(2), 343–347. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.009>
- Zikiou, A., Zidoune, M.N. (2019). Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 89–99. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12563>
- Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., Natalucci, C. L. (2012). *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheese-making. *LWT — Food Science and Technology*, 45(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>
- Kobayashi, H., Kusakabe, I., Murakami, K. (1983). Purification and Characterization of Two Milk-clotting Enzymes from *Irpex lacteus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(3), 551–558. <https://doi.org/10.1080/00021369.1983.10865677>
- Montgomery D. C. (2013). Design and analysis of experiments. 8th Ed. Wiley., 2013
- Working together to produce more cheese from milk. Электронный ресурс: <http://sdt-static.s3.amazonaws.com/media/uploads/2019/05/13/1CHR%20HANSEN190508%20SDT%20Presentation%20CHR%20Hansen.pdf> Дата обращения 28.02.2022
- Fermentation Chymosin: RENIFER Электронный ресурс: <http://proquiga.es/en/feed-additives/rennet-coagulants/chymosin/gmx-niv39.htm> Дата обращения 28.02.2022
- Harboe, M., Hubert, L., Van den Brink, H. La chymosine produite par fermentation. Chapter in book: *Présures et coagulants de substitution. Comment faire le bon choix?* (Ed. by J.-C. Collin). Editions Quae. 2015
- Kappeler, S. R., van der Brink, H. J. M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhhan, Z., Hansen, E.B. et al. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342(2), 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>
- HA-LA BIOTEC. CHY-MAX® SUPREME — A PRODUÇÃO DE QUEIJO EM UM NOVO PATAMAR. Электронный ресурс: http://halabiotech.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Ha-La_Biotec_147.pdf Дата обращения 28.02.2022

19. Harboe, M., Broe, M. L. Qvist, K. B. (2010). The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. Chapter in a book: Technology of cheesemaking. (ed. Law B. A., Tamime A. Y.), 2nd Ed. Chichester: Blackwell Publishing Ltd., 2010
20. Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>
21. Roller, S., Goodenough, P. W. (2012). Food enzymes. Chapter in book: Genetic Modification in the Food Industry. A Strategy for Food Quality Improvement (Ed. by S. Roller, S. Harlander). Springer. 2012
22. Preetha, S., Boopathy, R. (1997). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5), 573–578. <http://doi.org/10.1023/A:1018525711573>
23. PHYSIOLOGY AND MAINTENANCE — Vol. II — Industrial Use of Enzymes — Matti Leisola, Jouni Jokela, Ossi Pastinen, Ossi Turunen, Hans E. Schoemaker. Электронный ресурс: <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C03/E6-54-02-10.pdf> Дата обращения 28.02.2022
24. Yegin, S., Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism, inhibition, and engineering. *Dairy Science and Technology*, 93(6), 565–594. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0137-2>
25. Nestorovski, T., Velkoska-Markovska, L., Sbrinovska, S., Miskoska-Milevska, E., Petanovska-Ilievska, B., Popovski, Z.T. (2019). Different Approaches in Analyzing Chymosin Purity. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 73(3), 24–29
26. Andrén, A. (2011). Cheese: rennets and coagulants. *Encyclopedia of dairy science*. Pp. 574–578. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00069-8>
27. Moschopoulou E. Microbial Milk Coagulants. Chapter 11 in book: Microbial Enzyme Technology in Food Applications (Ed. by R. C. Ray and C. M. Rosell). Boca Raton. CRC Press. 2017
28. Garg, S. K., Johri, B. N. (1994). Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*, 10(3), 313–355. <https://doi.org/10.1080/87559129409541005>
29. Smith, J. L., Billings, G. E., Yada, R. Y. (1991). Chemical modification of amino groups in mureur miehei aspartyl proteinase, porcine pepsin, and chymosin. I. Structure and function. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(8), 2009–2016. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870915>
30. Garcia, H. S., Lopez-Hernandez, A., Hill, C. G. (2017). Enzyme Technology — Dairy Industry Applications. *Comprehensive Biotechnology* (Ed. Moo-Young M.) 3rd Ed. Pergamon. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00005-2>
31. Trono, D. (2019). Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. Chapter in a book: Advances in Enzyme Technology. (Ed. by Singh R. S., Singhanian R. R., Pandey A., Larroche C.). Elsevier B. V. 2019
32. Meito Microbial Rennet (MR) from *Rhizomucor pusillus* Lindt / *Rhizomucor miehei* Mucorpepsin (milk-clotting enzyme) EC3.4.23.23 Электронный ресурс: <http://www.meito-sangyo.co.jp/kaseihin/rennet/mr.html> Дата обращения 28.02.2022
33. Thunell, R. K., Duersch, J. W., Ernstrom, C. A. (1979). Thermal inactivation of residual milk clotting enzymes in whey. *Journal of Dairy Science*, 62(3), 373–377. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83254-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83254-3)
34. Higashi, T., Kobayashi Y., Iwasaki S. (1982). Microbial rennet having increased milk coagulating activity and method and method for production thereof. US Patent US4530906A. Электронный ресурс: <https://patents.google.com/patent/US4530906A/en> Дата обращения 28.02.2022
35. Мягконогов Д. С., Смыков И. Т., Абрамов Д. В., Делицкая И. Н., Овчинникова Е. Г. (2021). Влияние молокосвертывающих ферментов животного и микробного происхождения на качество и срок хранения мягких сыров. *Пищевые системы*, 4(4), 286–293. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-4-286-293>
36. Мягконогов Д. С., Мордвинова В. А., Абрамов Д. В., Овчинникова Е. Г., Муничева Т. Э. (2020). Технологические свойства молокосвертывающих ферментов разного происхождения. Часть I. Влияние вида МФП на процессы в сыродельной ванне. *Сыроделие и маслоделие*, 3, 16–19. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-3-16-19>
37. Мягконогов Д. С., Мордвинова В. А., Абрамов Д. В., Овчинникова Е. Г., Муничева Т. Э. (2020). Технологические свойства молокосвертывающих ферментов разного происхождения. Часть II. Влияние вида используемого МФП на процессы протеолиза при созревании сыров. *Сыроделие и маслоделие*, 5, 10–13. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-5-10-13>
38. Myagkonosov, D. S., Mordvinova, V. A., Delitskaya, I. N., Abramov, D. V., Ovchinnikova E. G. (2020). The influence of milk-clotting enzymes on the functional properties of pizza-cheeses. *Food Systems*, 3(3), 42–50. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-3-3-42-50>

REFERENCES

1. Langholm Jensen J., Mølgaard A., Navarro Poulsen J.-C., Harboe M. K., Simonsen J. B., Lorentzen A. M. et al. (2013). Camel and bovine chymosin: The relationship between their structures and cheese-making properties. *Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallography*, 69(5), 901–913. <https://doi.org/10.1107/S0907444913003260>
2. Guinee, T. P., Wilkinson, M. G. (1992). Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. *Journal of Society of Dairy Technology*, 45(4), 94–10. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.1992.tb01791.x>
3. Dekker, P. (2019). Dairy Enzymes. Chapter in a book: Industrial Enzyme Applications. (Ed. by Vogel A. and May O.), 1st Ed. — Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2019
4. Abd El-Salam, B. A. E.-Y., Ibrahim, O. A. E.-H., El-Sayed, H. A. E.-R. (2017). Purification and characterization of milk clotting enzyme from artichoke (*Cynara cardunculus* L.) flowers as coagulant on white soft cheese. *International Journal of Dairy Science*, 12(4), 254–265. <https://doi.org/10.3923/ijds.2017.254.265>
5. Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, A. K., Grover, S., Batish, V. K. (2006). Purification and characterization of milk clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). *Comparative Biochemistry and Physiology — B Biochemistry and Molecular Biology*, 145(1), 108–113. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.06.010>
6. Jacob, M. Milchgerinnungsenzyme verschiedener herkunft und ihr einfluss auf käseausbeute und käsequalität. Dissertation. Dresden: Technische Universität Dresden., 2011. Retrieved from <http://d-nb.info/1067190643/34> Accessed February 28, 2022
7. Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., Singh, S. A. (2010). Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1849–1859. <https://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2197-z>
8. Yuqiu, L., Tan, H., Da, L., Zhoulin, L., Yanping, C., Yuan Yuan, J. et al. (2015). Screening and Characterization of a Mutant Fungal Aspartic Proteinase from *Mucor pusillus*. *The Open Biotechnology Journal*, 9, 119–126. <http://doi.org/10.2174/1874070701509010119>
9. Shamtysan, M., Dmitriyeva, T., Kolesnikov, B., Denisova, N. (2014). Novel milk-clotting enzyme produced by *Coprinus lagopides* basidial mushroom. *LWT — Food Science and Technology*, 58(2), 343–347. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.009>
10. Zikiou, A., Zidoune, M. N. (2019). Enzymatic extract from flowers of Algerian spontaneous *Cynara cardunculus*: Milk-clotting properties and use in the manufacture of a Camembert-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 72(1), 89–99. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12563>
11. Brutti, C. B., Pardo, M. F., Caffini, N. O., Natalucci, C. L. (2012). *Onopordum acanthium* L. (Asteraceae) flowers as coagulating agent for cheesemaking. *LWT — Food Science and Technology*, 45(2), 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.001>
12. Kobayashi, H., Kusakabe, I., Murakami, K. (1983). Purification and Characterization of Two Milk-clotting Enzymes from *Irpex lacteus*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47(3), 551–558. <https://doi.org/10.1080/0021369.1983.10865677>
13. Montgomery D. C. (2013). Design and analysis of experiments. 8th Ed. Wiley., 2013
14. Working together to produce more cheese from milk. Retrieved from <http://sdt-static.s3.amazonaws.com/media/uploads/2019/05/13/1CHR%20HANSEN190508%20SDT%20Presentation%20CHR%20Hansen.pdf> Accessed February 28, 2022
15. Fermentation Chymosin: RENIFER Retrieved from <https://proquiga.es/en/feed-additives/rennet-coagulants/chymosin/gmx-niv39.htm> Accessed February 28, 2022
16. Harboe, M., Hubert, L., Van den Brink, H. La chymosine produite par fermentation. Chapter in book: Présures et coagulants de substitution. Comment faire le bon choix? (Ed. by J.-C. Collin). Editions Quae. 2015
17. Kappeler, S. R., van der Brink, H. J. M., Rahbek-Nielsen, H., Farah, Z., Puhan, Z., Hansen, E. B. et al. (2006). Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>
18. HA-LA BIOTEC. CHY-MAX® SUPREME — A PRODUÇÃO DE QUEIJO EM UM NOVO PATAMAR Retrieved from http://halabiotec.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Ha-La-Biotec_147.pdf Accessed February 28, 2022
19. Harboe, M., Broe, M. L. Qvist, K. B. (2010). The Production, Action and Application of Rennet and Coagulants. Chapter in a book: Technology of cheesemaking. (ed. Law B. A., Tamime A. Y.), 2nd Ed. Chichester: Blackwell Publishing Ltd., 2010
20. Jacob, M., Jaros, D., Rohm, H. (2011). Recent advances in milk clotting enzymes. *International Journal of Dairy Technology*, 64(1), 14–33. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>
21. Roller, S., Goodenough, P. W. (2012). Food enzymes. Chapter in book: Genetic Modification in the Food Industry. A Strategy for Food Quality Improvement (Ed. by S. Roller, S. Harlander). Springer. 2012
22. Preetha, S., Boopathy, R. (1997). Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Rhizomucor miehei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(5), 573–578. <http://doi.org/10.1023/A:1018525711573>
23. PHYSIOLOGY AND MAINTENANCE — Vol. II — Industrial Use of Enzymes — Matti Leisola, Jouni Jokela, Ossi Pastinen, Ossi Turunen, Hans E. Schoemaker. Retrieved from <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C03/E6-54-02-10.pdf> Accessed February 28, 2022
24. Yegin, S., Dekker, P. (2013). Progress in the field of aspartic proteinases in cheese manufacturing: structures, functions, catalytic mechanism,

- inhibition, and engineering. *Dairy Science and Technology*, 93(6), 565–594. <https://doi.org/10.1007/s13594-013-0137-2>
25. Nestorovski, T., Velkoska-Markovska, L., Sbrinova, S., Miskoska-Milevska, E., Petanovska-Ilievska, B., Popovski, Z.T. (2019). Different Approaches in Analyzing Chymosin Purity. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*, 73(3), 24–29
 26. Andrén, A. (2011). Cheese: rennets and coagulants. *Encyclopedia of dairy science*. Pp. 574–578. <https://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374407-4.00069-8>
 27. Moschopoulou E. Microbial Milk Coagulants. Chapter 11 in book: *Microbial Enzyme Technology in Food Applications* (Ed. by R. C. Ray and C. M. Rosell). Boca Raton. CRC Press. 2017
 28. Garg, S. K., Johri, B. N. (1994). Rennet: current trends and future research. *Food Reviews International*, 10(3), 313–355. <https://doi.org/10.1080/87559129409541005>
 29. Smith, J. L., Billings, G. E., Yada, R. Y. (1991). Chemical modification of amino groups in mucor miehei aspartyl proteinase, porcine pepsin, and chymosin. I. Structure and function. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(8), 2009–2016. <https://doi.org/10.1080/00021369.1991.10870915>
 30. Garcia, H. S., Lopez-Hernandez, A., Hill, C. G. (2017). Enzyme Technology — Dairy Industry Applications. *Comprehensive Biotechnology* (Ed. Moo-Young M.) 3rd Ed. Pergamon. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00005-2>
 31. Trono, D. (2019). Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. Chapter in a book: *Advances in Enzyme Technology*. (Ed. by Singh R. S., Singhanian R. R., Pandey A., Larroche C.). Elsevier B. V. 2019
 32. Meito Microbial Rennet (MR) from Rhizomucor pusillus Lindt / Rhizomucor miehei Mucorpepsin (milk-clotting enzyme) EC3.4.23.23 Retrieved from <http://www.meito-sangyo.co.jp/kaseihin/rennet/mr.html> Accessed February 28, 2022
 33. Thunell, R. K., Duersch, J. W., Ernstrom, C. A. (1979). Thermal inactivation of residual milk clotting enzymes in whey. *Journal of Dairy Science*, 62(3), 373–377. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(79\)83254-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(79)83254-3)
 34. Higashi, T., Kobayashi Y., Iwasaki S. (1982). Microbial rennet having increased milk coagulating activity and method and method for production thereof. US Patent US4530906A. Retrieved from <http://patents.google.com/patent/US4530906A/en> Accessed February 28, 2022
 35. Myagkonosov, D. S., Smykov, I. T., Abramov, D. V., Delitskaya, I. N., Ovchinnikova, E. G. (2021). Influence of milk-clotting enzymes of animal and microbial origin on the quality and shelf life of soft cheeses. *Food Systems*, 4(4), 286–293. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2021-4-4-286-293> (In Russian)
 36. Myagkonosov, D. S., Mordvinova V. A., Abramov, D. V., Ovchinnikova E. G., Municheva T. E. (2020). Technological properties of milk clotting enzymes of different origin. Part I. The effect of the type of used milk clotting enzyme on processes in a cheesemaking bath. *Cheesemaking and Buttermaking*, 3, 16–19. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-3-16-19> (In Russian)
 37. Myagkonosov D. S., Mordvinova V. A., Abramov D. V., Ovchinnikova E. G., Municheva T. E. (2020). Technological properties of milk clotting enzymes of different origin. Part II. Influence of the type of milk clotting enzyme used on proteolysis processes during cheese ripening. *Cheesemaking and Buttermaking*, 5, 10–13. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2020-5-10-13> (In Russian)
 38. Myagkonosov, D. S., Mordvinova, V. A., Delitskaya, I.N., Abramov, D. V., Ovchinnikova E. G. (2020). The influence of milk-clotting enzymes on the functional properties of pizza-cheeses. *Food Systems*, 3(3), 42–50. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2020-3-3-42-50>

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
Принадлежность к организации	Affiliation
Мягконосов Дмитрий Сергеевич — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления исследований по прикладной биохимии и энзимологии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-915-973-63-13 E-mail: d.myagkonosov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * автор для контактов Абрамов Дмитрий Васильевич — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, руководитель направления биохимических исследований по сыроделию и маслоделию, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-910-970-42-97 E-mail: d.abramov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932 Делицкая Ирина Николаевна — кандидат технических наук, старший научный сотрудник, отдел сыроделия, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-48532-98-1-28 E-mail: i.delitskaya@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3587-4050 Овчинникова Елена Григорьевна — научный сотрудник, отдел биохимии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская область, г. Углич, Красноармейский бульвар, 19 Тел.: +7-48532-98-1-94 E-mail: e.ovchinnikova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4891-4330	Dmitry S. Myagkonosov, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Head of Research Department in Applied Biochemistry and Enzymology, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-915-973-63-13 E-mail: d.myagkonosov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4443-7573 * corresponding author Dmitry V. Abramov, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Head of Biochemical Research in Cheesemaking and Buttermaking, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-910-970-42-97 E-mail: d.abramov@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0001-8326-1932 Irina N. Delitskaya, Candidate of Technical Sciences, Senior Researcher, Department of Cheesemaking, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-48532-98-1-28 E-mail: i.delitskaya@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-3587-4050 Elena G. Ovchinnikova, Researcher, Department of Biochemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 152613, Yaroslavl Region, Uglich, Krasnoarmeysky Boulevard, 19. Tel.: +7-48532-98-1-94 E-mail: e.ovchinnikova@fncps.ru ORCID: https://orcid.org/0000-0003-4891-4330
Критерии авторства	Contribution
Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.	Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.
Конфликт интересов	Conflict of interest
Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.	The authors declare no conflict of interest.