

ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТНЫХ СИСТЕМ ПЛЕСНЕВЫХ ГРИБОВ

В статье приведены результаты исследования активности ферментных систем плесневых грибов. Приведены данные о ферментных системах исследуемых видов плесневых грибов. Представлены значения активности ферментных систем в мицелии плесневых грибов рода *Penicillium*. Установлена активность окислительных ферментов в мицелии плесневых грибов в оптимальных условиях. Представлены данные об изменении протеолитической активности ферментных систем плесневых грибов в зависимости от относительной влажности воздуха. Изучено влияние активной кислотности среды на стабильность протеолитической активности плесневых грибов рода *Penicillium*. Показана зависимость протеолитической активности ферментных систем плесневых грибов от температуры.

Сыр, белая и голубая плесень, ферментные системы плесневых грибов.

Введение

С развитием знаний в области механизма формирования органолептических и физико-химических свойств сыров все более очевидной становится роль протеолитических, липолитических и других окислительно-восстановительных процессов, осуществляемых ферментными системами микроорганизмов, которые участвуют в формировании их качественных показателей и биологической ценности как пищевых продуктов.

Как считают ученые, управление процессами созревания сыров наряду со знанием физиолого-биохимических свойств микроорганизмов во многом построено на активности входящих в состав микрофлоры заквасок. При этом знание свойств, специфичности и активности используемых ферментных препаратов, а также нативных ферментных систем молока наряду с оценкой их роли в формировании специфического вкусового букета позволяет достигнуть требуемых показателей качества [1, 2].

Протеолитические и липолитические процессы наряду с гидролизом лактозы относятся к ряду ключевых биохимических реакций в созревающем сыре. Липазы, входящие в состав мококоствертывающих ферментных препаратов, также принимают активное участие в созревании сыра. Активизация липолитических и протеолитических процессов в сырах способствует интенсификации их созревания [3].

Протеолиз и липолиз в сырах были предметом активных исследований в последние десятилетия, а благодаря совершенствованию аналитических методов, используемых для мониторинга указанных процессов и моделей, во многих видах сыров в настоящее время эти процессы достаточно подробно исследованы [1–3]. Тем не менее, как показывают результаты работ отечественных и зарубежных исследователей, большинство бактерий, используемых в сыроделии, обладают комплексом протеолитической и липолитической активности, а применительно к сырам, созревающим с использованием плесневых грибов, результаты этих исследований пока широко не представлены. В связи с этим дальнейшие исследования посвящены изучению ферментных систем плесневых грибов рода *Penicillium*.

Материалы и методы

Определение общего азота проводили с помощью анализатора белка RAPID N ELEMENTAR в соответствии с европейскими стандартами. Принцип метода заключается в определении азота за счет сжигания анализируемого вещества известной массы в условиях высокой температуры (около 900 °С) камеры в присутствии кислорода, что приводит к высвобождению углекислого газа, воды и азота, массовая доля которого детектируется прибором.

Концентрацию белка определяли спектрофотометрически при A280. Удельную активность определяли спектрофотометрически при 290 нм на спектрофотометре DU 800 (Beckman Coulter).

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 приведены данные о ферментных системах исследуемых видов плесневых грибов. Судя по представленным данным, можно предположить, что плесневые грибы рода *Penicillium* оказывают глубокое воздействие на белки, которые трансформируются в пептиды с высокой и низкой молекулярной массой, а также аминокислоты. Внеклеточная протеолитическая система *Penicillium* состоит из двух пептидаз: одной кислой протеиназы – аспаратпротеиназы (оптимальный уровень pH 3,5–4,0; но сохраняет активность в диапазоне pH 3,5–6,0) и одной металлопротеазы (оптимальный уровень pH 5,5–6,0). Синтезируемые плесневыми грибами внеклеточные пептидазы осуществляют глубокое расщепление α - и β -казеинов. Кислая протеиназа атакует главным образом три следующие связи: $\text{Lus}_{29}\text{-Phe}_{30}$; $\text{Lus}_{97}\text{-Val}_{96}$; $\text{Lus}_{99}\text{-Glu}_{100}$, выделяя пептиды $\text{Phe}_{30}\text{-Val}_{29}$; $\text{Val}_{98}\text{-Val}_{209}$; $\text{Glu}_{100}\text{-Val}_{209}$, которые в больших количествах обнаруживаются в зрелых сырах. Металлопротеаза также расщепляет β -казеин, в частности, наблюдалось расщепление связей $\text{Lus}_{28}\text{-Lus}_{29}$; $\text{Pro}_{90}\text{-Glu}_{91}$; $\text{Glu}_{100}\text{-Ala}_{101}$.

В сырах доминирует активность кислой протеиназы *Penicillium*. Количество пептидов, образуемых кислой протеазой, увеличивается, несмотря на то, что величина показателя pH мало способствует его активности. В асептическом сгустке, не содержащем микрофлоры, кислая протеиназа *Penicillium* вызывает большое увеличение содержания растворимого

при pH 4,6 азота и небольшое – свободных аминокислот.

Таблица 1

Ферментные системы плесневых грибов *Penicillium*

№ п/п	Название	Оптimum действия	Объект действия фермента	Продукты гидролиза
Внеклеточные протеазы				
1	Кислая протеаза	pH 3,5–4,0; сохраняет активность при pH 3,5–6,0	α_{s1} , β -казеин, связи: Lus ₂₉ -Phe ₃₀ ; Lus ₉₇ -Val ₉₆ ; L11S99-Glu00	Пептиды: Glu ₁₀₀ -Val ₂₀₉ ; Val ₉₈ -Val ₂₀₉ ; Ghi ₁₀₀ -Val ₂₀₉
2	Металлопротеаза	pH 5,5–6,0	β -казеин, связи: Lus ₂₈ -Lys ₂₉ ; Pro ₉₀ -Glu ₉₁ ; Glu ₁₀₀ -Ala ₁₀₁	–
Внутриклеточные пептидазы				
3	Кислая карбоксипептидаза	pH 3,5–4,0	Пептиды	Низкомолекулярные пептиды, аминокислоты, амины, аммиак
4	Щелочная аминопептидаза	pH 7,5–8,0, по другим сведениям pH 5,5–6,5	Пептиды	Низкомолекулярные пептиды, аминокислоты
5	Щелочная карбоксипептидаза	Присутствует не во всех штаммах		
Внеклеточные липазы				
6	Кислая липаза	pH 6,0–6,5	Трикапроин	Свободные жирные кислоты, в большей степени капроновая
7	Щелочная липаза	pH 7,5–8,0	Трибутирин	Свободные жирные кислоты, в большей степени масляная

Внутриклеточные пептидазы пенициллов исследованы недостаточно. Как полагают, в зависимости от штамма *Penicillium* может синтезировать кислую и щелочную карбоксипептидазу, щелочные аминопептидазы. Внутриклеточные пептидазы, выделяемые этими плесневыми грибами, осуществляют глубокое расщепление присутствующих пептидов и лежат в основе образования значительных количеств аминокислот, аминов и аммиака, обнаруживаемых в сырах с плесенью.

Внутриклеточные пептидазы, обнаруживаемые во всех штаммах *Penicillium*, представлены одной

карбоксипептидазой (оптимальный pH 3,5–4,0) и аминопептидазой (оптимальный pH 7,5–8,0). Таким образом, протеолитические системы *Penicillium* отличаются большим разнообразием в отношении синтезируемых ферментов и играют определяющую роль в протеолизе, который обеспечивает образование важных слагаемых аромата сыров с плесенью.

В табл. 2 представлены значения активности ферментных систем в мицелии плесневых грибов рода *Penicillium*.

Таблица 2

Активность протеолитических и липолитических ферментов в мицелии плесневых грибов рода *Penicillium*

Фермент	Активность ферментных систем, $\mu\text{M}(\text{субстрата}) / \text{мг}(\text{белка}) \cdot \text{ч}$		
	<i>P. roqueforti</i>	<i>P. camemberti</i>	<i>P. caseicolum</i>
Кислая протеаза	1,345±0,081	1,045±0,063	1,189±0,071
Металлопротеаза	1,154±0,008	1,030±0,062	1,120±0,067
Кислая карбоксипептидаза	1,391±0,069	1,129±0,068	1,150±0,079
Щелочная аминопептидаза	1,489±0,089	1,042±0,013	1,146±0,069
Кислая липаза	1,140±0,069	1,008±0,063	1,059±0,064

Щелочная липаза	1,696±0,101	1,262±0,079	1,432±0,089
-----------------	-------------	-------------	-------------

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что наибольшее значение активности ферментных систем у рассматриваемых плесневых грибов наблюдается у *P. roqueforti* и составляет максимальное значение $1,696 \frac{\text{мкМ(субстрата)}}{\text{мг(белка)} \cdot \text{ч}}$ для щелочной липазы, минимальное значение $1,140 \frac{\text{мкМ(субстрата)}}{\text{мг(белка)} \cdot \text{ч}}$ для кислой липазы.

Наименьшие показатели характерны для *P. camemberti*, при этом значение активности кислой протеиназы меньше в 1,29 раза, для металлопротеазы – в 1,19 раза, для кислой карбоксипептидазы –

в 1,23 раза, для щелочной протеиназы – 1,43 раза, для кислой липазы – в 1,13 раза и для щелочной липазы – в 1,34 раза. Полученные данные могут быть использованы при разработке технологии получения сыров, созревающих при использовании плесневых грибов, поскольку это позволяет регулировать процессы протеолиза и липолиза в сырах, вырабатываемых по соответствующей технологии.

В табл. 3 показана активность окислительных ферментов в мицелии плесневых грибов в оптимальных условиях.

Таблица 3

Активность окислительных ферментов в мицелии плесневых грибов

Фермент	Активность окислительных ферментов, $\frac{\text{мкМ(субстрата)}}{\text{мг(белка)} \cdot \text{ч}}$		
	<i>P. roqueforti</i>	<i>P. camemberti</i>	<i>P. caseicolum</i>
Лактатдегидрогеназа	0,257±0,014	0,199±0,010	0,236±0,013
Малатдегидрогеназа	0,154±0,008	0,131±0,011	0,145±0,008
Сукцинатдегидрогеназа	0,191±0,010	0,159±0,008	0,180±0,009
Глутаматдегидрогеназа	0,256±0,013	0,145±0,013	0,245±0,012
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	0,148±0,007	0,097±0,006	0,129±0,006
Глюкозооксидаза	0,173±0,009	0,112±0,007	0,154±0,009
Аскорбатоксидаза	0,097±0,005	0,045±0,003	0,067±0,003

Сопоставляя приведенные в табл. 3 данные и результаты исследований, опубликованных в литературных источниках, можно констатировать, что активность окислительных ферментов у плесневых грибов достаточно высока. Тем не менее обнаружены весьма существенные различия показателей активности в зависимости от конкретного изучаемого объекта, а также более высокие значения исследуемого параметра, характерного для *P. roqueforti*, при минимальных показателях у *P. camemberti*.

Так, если сравнивать максимальные и минимальные значения активности, то установлено, что для лактатдегидрогеназы различия между максимальными (*P. roqueforti*) и минимальными значениями (*P. camemberti*) составили 1,3 раза; для малатдегидрогеназы – 1,2 раза; сукцинатдегидрогеназы – 1,2 раза; глутаматдегидрогеназы – 1,8 раза; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – 1,5 раза; глюкозооксидазы и аскорбатоксидазы – 1,6 и 2,2 раза соответственно.

Эти данные не только объясняют высокую протеолитическую и липолитическую активность исследуемых микроорганизмов, но и позволяют обосновать параметры технологического процесса производства сыров, созревающих с использованием плесневых грибов рода *Penicillium*.

Известно, что при ферментации казеина плесневыми грибами образуется разнообразный набор продуктов протеолиза. В теоретическом плане данная проблема изучена еще недостаточно. Тем не менее большинство исследователей склонны считать, что при оценке протеолитических свойств плесневых грибов следует проводить исследования на системе модельного сыра при соответствующем контроле.

Однако в связи с определенными сложностями, связанными с проведением таких экспериментов, большинство исследований проводится на обезжиренном молоке в качестве субстрата.

Развитие плесневых грибов при выработке сыра происходит в присутствии сычужного фермента, используемого для коагуляции молока и получения сырного зерна. Сычужный фермент наряду со специфичной реакцией отщепления гликомакропептида от к-казеина на участке Фал₁₀₅-Мет₁₀₆ при свертывании молока в процессе созревания сыра гидролизует (α_{s1} - и β -казеины). В результате действия сычужного фермента на казеин образуются в основном (около 50 %) полипептиды с молекулярной массой менее 16 000 Дальтон и немного (около 5 %) пептидов с молекулярной массой менее 3000 Дальтон. Эта реакция неспецифичного протеолиза, по мнению многих исследователей, важна в сыре с плесневыми грибами с точки зрения получения необходимой консистенции и вкуса, а также с точки зрения подготовки субстрата для действия протеолитических ферментов плесневых грибов рода *Penicillium*.

В сыроделии давно бытуют понятия «глубина» и «ширина» протеолиза. Под «глубиной» понимается степень гидролиза белка до свободных аминокислот, а под «шириной» – общие масштабы протеолитических процессов. И «глубина» и «ширина» протеолиза оказывают существенное влияние на органолептические показатели зрелых сыров. Эти факты свидетельствуют о необходимости оценки протеолитической активности культур плесневых грибов по нескольким показателям.

В табл. 4 представлены данные об изменении протеолитической активности ферментных систем

плесневых грибов в зависимости от относительной влажности воздуха. Протеолитическую активность

измеряли при активной кислотности, равной 7,5, и температуре 30 ± 1 °С.

Таблица 4

Зависимость протеолитической активности ферментных систем плесневых грибов от относительной влажности воздуха

Культура плесневых грибов	Протеолитическая активность, усл.ед./г, при относительной влажности воздуха, %				
	60±5	70±5	80±5	90±5	95±5
<i>P. roqueforti</i>	67 400±3375	70 100±3510	73 400±3690	77 500±4650	75 700±4555
<i>P. camemberti</i>	37 500±1880	41 200±2075	45 200±2712	48 400±2904	45 200±2712
<i>P. caseicolum</i>	57 400±2870	61 400±3095	65 100±3910	67 800±4068	65 300±3918

Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют о том, что наибольшая протеолитическая активность у всех рассматриваемых плесневых грибов рода *Penicillium* наблюдается при относительной влажности воздуха 90 ± 5 %. При этом для плесени вида *P. roqueforti* это значение составляет 77 500 усл.ед./г, для *P. camemberti* – 48 400, для *P. caseicolum* – 67 800. Наименьшая протеолитическая активность у всех рассматриваемых плесневых грибов рода *Penicillium* наблюдается при относитель-

ной влажности воздуха 60 ± 5 %. Данный факт, очевидно, связан с деятельностью самого микроорганизма в условиях различной влажности, а именно обводненностью и доступностью субстратов, проницаемостью клеточных оболочек и рядом других факторов.

В дальнейших исследованиях изучали влияние активной кислотности среды на стабильность протеолитической активности плесневых грибов рода *Penicillium* (табл. 5).

Таблица 5

Зависимость протеолитической активности ферментных систем плесневых грибов от активной кислотности среды

Культура плесневых грибов	Протеолитическая активность, усл.ед./г, при активной кислотности среды			
	3,00±0,05	4,50±0,05	6,00±0,05	7,50±0,05
<i>P. roqueforti</i>	78 700±4722	76 900±4615	76 200±4585	77 500±4650
<i>P. camemberti</i>	48 600±2924	50 300±3025	46 700±2812	48 400±2904
<i>P. caseicolum</i>	65 300±3920	68 000±4090	67 500±4050	67 800±4068

Анализ данных, представленных в табл. 5, показал, что наибольшая протеолитическая активность для *P. roqueforti* наблюдается при активной кислотности, равной 3,00, для *P. camemberti* – 4,50 и для *P. caseicolum* – 4,50 и составляет 78 700; 50 300 и 68 000 усл.ед./г соответственно. Наименьшая протеолитическая активность для *P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. caseicolum* наблюдается при активной кислотности 7,50 и составляет 75 700; 45 200 и 65 300 усл.ед./г

соответственно. Следует отметить достаточно высокую активность плесневых грибов во всем диапазоне исследуемых значений активной кислотности.

В табл. 6 показана зависимость протеолитической активности ферментных систем плесневых грибов от температуры. Температурный фактор варьировали в пределах рабочих температур для указанных видов микроорганизмов, учитывая, однако, температурные параметры выработки сыров указанной группы.

Таблица 6

Зависимость протеолитической активности ферментных систем плесневых грибов от температуры

Культура плесневых грибов	Протеолитическая активность, усл.ед./г, при температуре, °С				
	10,0±0,20	20,0±0,20	30,0±0,20	40,0±0,20	50,0±0,20
<i>P. roqueforti</i>	52 300±3145	65 400±3930	78 900±4738	82 300±4938	78 700±4730
<i>P. camemberti</i>	47 800±2875	51 300±3080	45 600±2740	38 300±2305	32 400±1944
<i>P. caseicolum</i>	44 300±2580	58 500±3510	67 400±4045	55 600±3345	48 900±2935

Данные, представленные в табл. 6, свидетельст-

вуют о том, что наибольшая протеолитическая ак-

тивность плесневых грибов вида *P. roqueforti* наблюдается при температуре 40,0 °С. Для плесневых грибов *P. caseicola* максимальная протеолитическая активность плесневых грибов отмечается при температуре 20,0 °С и составляет 51 300 усл.ед./г.

Дальнейшее увеличение температуры сопровождается снижением протеолитической активности плесневых грибов данного вида. Как показали проведенные эксперименты, *P. camemberti* по сравнению с другими пенициллами обладает максимальной протеолитической активностью при температуре 30 °С и составляет 67 400 усл.ед./г.

Для более детальной оценки роли протеолитических процессов в формировании пептидного профиля сыров, созревающих при участии плесневых грибов, нами проведена дополнительная серия экспериментов, связанная с установлением качественного и количественного состава веществ, образующихся при ферментации.

Сопоставляя результаты исследований, представленных в табл. 4, 5 и 6, можно обнаружить корреляцию между установленными значениями протеолитической активности ферментных систем и значениями технологических факторов.

Известно, что ферментативные реакции являются основой протекания процессов, лежащих в основе формирования органолептических характеристик сы-

ров. Из большого числа локальных актов фермента-

тивных реакций наибольшее значение по праву играют протеолитические и липолитические процессы.

Таким образом, результаты исследований активности ферментных систем плесневых грибов *Penicillium* позволили установить значения наиболее важных ферментных систем, участвующих в созревании сыров. Изучены особенности протекания ферментных реакций в мицелии грибов *Penicillium* в зависимости от температуры, активной кислотности и относительной влажности воздуха при различных условиях культивирования. Установлены значения активности кислых и щелочных протеаз и липаз, окислительных ферментов (лактатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глюкозооксидазы, аскорбатоксидазы).

Показана возможность регулирования активности ферментных систем плесневых грибов в условиях варьирования технологических факторов (температуры, активной кислотности и влажности среды). Оптимум pH для *P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. caseicola* составляет: 3,0; 4,5; 4,5; оптимум температуры – 8, 10, 12 °С; оптимум относительной влажности воздуха – 95, 90, 90 % соответственно.

Установлена более высокая активность ферментных систем *P. roqueforti* по сравнению с другими исследуемыми видами *Penicillium*. Показана предпочтительная возможность атаки на белковых молекулах-субстратах по месту отдельных связей.

Список литературы

1. Горбатова, К.К. Биохимия молока и молочных продуктов / К.К. Горбатова. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 344 с.
2. Диланян, З.Х. Сыроделие / З.Х. Диланян. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 280 с.
3. Крусъ, Г.Н. Технология молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусъ, А.Г. Храмова, З.В. Волокитина, С.В. Карнычев; под ред. А.М. Шалыгиной. – М.: КолосС, 2004. – 455 с.

ЗАО фирма «Калория»,
353720, Россия, Краснодарский край,
Каневский район, ст. Стародеревянковская,
ул. Украинская, 100.
Тел./факс: (861-64) 7-15-31
e-mail: sales@kaloriya.ru

SUMMARY

T.N. Sadovaya

Activity of mold fungi ferment systems

The results of researches on the activity of mold fungi ferment systems are considered. Presented are the data on ferment systems of investigated kinds of mold fungi. The activity values of ferment systems in the myceliums of mold fungi of the genus of *Penicillium* are presented. The activity of oxidizing enzymes in the mycelium of mold fungi in optimum conditions has been established. The data on the change of proteolytic activity of mold fungi ferment systems depending on relative humidity are presented. The influence of the medium active acidity on the proteolytic activity stability of mold fungi of the genus of *Penicillium* has been studied. The dependence of proteolytic activity of mold fungi ferment systems from temperature has been shown.

Cheese, white and blue mold, ferment systems of mold fungi.

«Kaloriya» Firm
100 Ukrainskaya Str., st. Starodereviankovskaya,
Kanevskoy district, Krasnodar Region, Russia, 353720
Phone/Fax: 7 (86164) 7-15-31

