

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ НАТИВНОГО ФЕРМЕНТА ПЛАЗМИНА В МОЛОКЕ И МОЛОЧНОМ СЫРЬЕ

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

Елена Ивановна Мельникова, д-р техн. наук, профессор, профессор кафедры технологии продуктов животного происхождения

Мария Сергеевна Чекмарева, аспирант

Екатерина Викторовна Богданова, д-р техн. наук, доцент, профессор кафедры технологии продуктов животного происхождения

E-mail: ek-v-b@yandex.ru

Воронежский государственный университет инженерных технологий, г. Воронеж

В работе изучена возможность адаптации спектрофотометрического метода определения активности нативной ферментной системы «плазмин – плазминоген» для анализа нормализованной смеси с концентратом мицеллярного казеина, сыра с высокой температурой второго нагревания и подсырной сыворотки. В процессе гидролиза казеина во время созревания твердого сыра плазмин может изменять свойства казеиновой сетки, скорость созревания и текстуру конечного продукта. В связи с представленной актуальностью цель работы – оценка активности нативных ферментов системы «плазмин – плазминоген» в нормализованных смесях для производства твердого сыра с высокой температурой второго нагревания и их влияния на протеолиз сырного теста. Установлено, что активность плазмينا выше в концентрате мицеллярного казеина, а также в опытном образце сыра на третий день созревания в сравнении с контрольным образцом. В конце созревания опытного образца сыра наблюдалось снижение количественного содержания фермента, что свидетельствует о высвобождении аминокислот из пептидов, фермент остается связанным с белковым матриксом и не переходит в подсырную сыворотку. Аминокислотный анализ свидетельствует, что скорость высвобождения аминокислот в сыре с концентратом мицеллярного казеина выше в 1,35 раза, что позволяет в равных условиях сократить сроки созревания сыров примерно на 20 %. Результаты исследования доказывают возможность применения спектрофотометрического метода для контроля активности ферментной системы «плазмин – плазминоген» в сыроделии с последующей корректировкой технологических режимов и производственных процессов.

Ключевые слова: твердые сыры, концентрат мицеллярного казеина, активность плазмينا, микроструктура, спектрофотометрия

Для цитирования: Мельникова, Е. И. Определение активности нативного фермента плазмينا в молоке и молочном сырье / Е. И. Мельникова, М. С. Чекмарева, Е. В. Богданова // Молочная промышленность. 2026. № 5. С. 70–75. <https://doi.org/10.21603/1019-8946-2026-5-104>

ВВЕДЕНИЕ

Основными задачами для сыродельной промышленности является совершенствование и актуализация методов определения качества, введение дополнительных способов мониторинга, а также идентификации с целью контроля пищевой безопасности и улучшения качества готового продукта. Изучение влияния ферментов и определение их активности имеет важное значение для сыроделия. Необходимы высокочувствительные, быстрые, простые и доступные методы исследования. Совершенствование методики входного контроля позволяет улучшить мониторинг и рационально регулировать технологический процесс в период сезонных колебаний состава сырья.

Для сыроделия важное значение имеют не только вносимые или продуцируемые микроорганизмами ферменты, но и нативные, поступающие из тканей молочных желез или высвобождающиеся из соматических клеток.

Все ферменты молока подразделяются на несколько групп и являются связанными со следующими компонентами (рис. 1).

В молоке, как и в крови, присутствует сложная система протеаз плазминоген / плазмينا, состоящая из плазмينا, плазминогена, активаторов плазминогена, ингибиторов плазмينا и ингибиторов – активаторов плазминогена [2, 3]. Плазмин молока – нативный фермент, преимущественно связанный с остатками лизина в молекулах казеиновых фракций и, в основном (~ 90 %), присутствующий в виде неактивного зимогена, плазминогена [4]. Это сериновая протеаза с молекулярной массой 83 кДа, участвующая в протеолитических процессах, определяющих формирование вкуса и аромата сыра во время созревания [5, 6]. Активный плазмин гидролизует молочные белки, образуя пептиды (около 23 видов), изменяющие сенсорное восприятие молочного сырья [7, 8]. Концентрация плазмينا в коровьем молоке может варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая породу коровы, сезон, кормовой рацион, стадию лактации и состояние здоровья животного. Плазмин относительно термоустойчив, кратковременный нагрев до 74 °C с выдержкой 15 с вызывает частичную инактивацию, полная инактивация происходит при температуре выше 142 °C с выдержкой более 15 с [9].

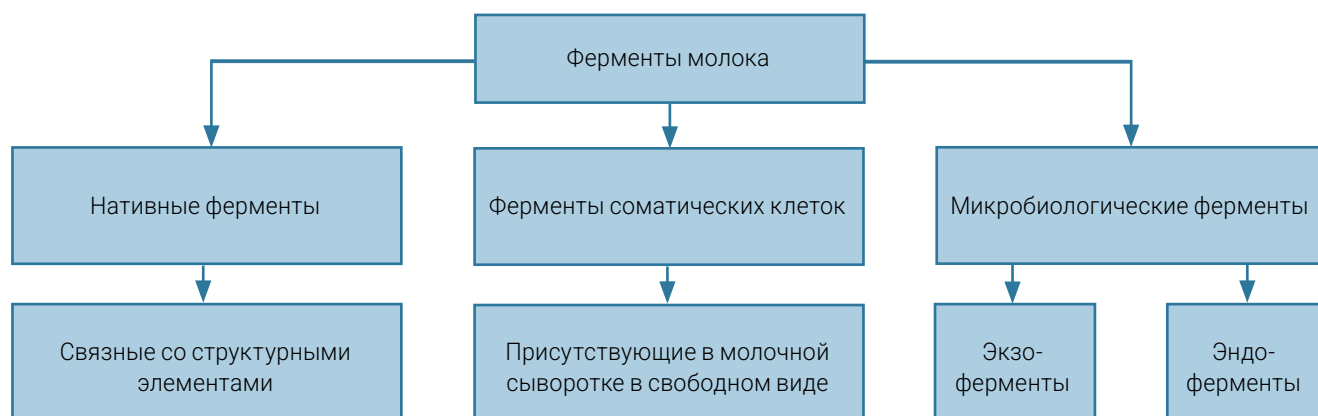


Рисунок 1. Классификация ферментов молока по их происхождению [1]

Высокая термоустойчивость фермента объясняется защитным действием казеина, который препятствует необратимой инактивации развернутой молекулы фермента [10]. В свободной форме плазмин необратимо инактивируется при температуре 55–65 °C [9]. Плазминоген, плазмин и активатор плазминогена связаны с мицеллами казеина [8] и обычно переходят в сгусток, а затем в сыр, ингибиторы при технологическом процессе теряются с сывороткой.

При внесении сычужного фермента система «плазмин – плазминоген» связывается с мицеллами казеина и концентрируется в сырном зерне. Во время созревания сыра казеины предпочтительным образом гидролизуются различными протеазами. Плазмин гидролизует β - и α_{s2} -казеин и практически не влияет на α_{s1} -казеин [5]. Исследования показывают, что активность плазмينا в сыре зависит от режимов термической обработки и поставки сырного зерна [6]. Во многих сырах с высокой температурой второго нагревания, например пармезане и чеддере, плазмин принимает значительное участие в гидролизе казеина и изменении структуры сыра после денатурации химозина при тепловой обработке. Под действием плазмينا образуются крупные пептиды, не влияющие на вкус сыра, способные дальше гидролизироваться ферментами заквасочной микрофлоры до олигопептидов и свободных аминокислот, увеличивая степень протеолиза в готовом продукте [1, 5, 10].

Содержание казеиновых фракций при производстве твердых сыров является важным показателем, т. к. казеин создает белковый матрикс, формирует органолептические дескрипторы, а также влияет на скорость созревания и выход готового продукта. Применение концентрата мицеллярного казеина в качестве компонента нормализации в сыроделии

позволяет стандартизировать массовую долю белка и поддерживать коэффициент нормализации за счет высокого содержания нативных казеиновых фракций (85–95 % от общего количества белка) [11–16]. Это обуславливает количественное увеличение плазмينا, связанного с мицеллами казеина.

В соответствии с представленной актуальностью **цель работы** – оценка активности нативных ферментов системы «плазмин – плазминоген» в нормализованных смесях для производства твердого сыра с высокой температурой второго нагревания и их влияния на протеолиз сырного теста.

Для достижения данной цели поставлены и решены следующие задачи:

- адаптация спектрометрического метода для анализа содержания плазмينا в молочных системах;
- определение активности ферментной системы «плазмин – плазминоген» в заданных объектах исследования.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – молоко сырое, концентрат мицеллярного казеина (КМК), нормализованная смесь для твердого сыра с применением КМК в количестве 10 % (с целью поддержания коэффициента нормализации м. д. ж./м. д. б. – 0,8), сыр Д + 3 (на третий день созревания), Д + 70 (сыр на 70 день созревания), сыворотка подсырная, субстрат с урокиназой без молочной сыворотки – контрольный образец.

Исследования проводились в период с сентября 2024 г. по февраль 2025 г. в экспериментальных, исследовательских и производственных лабораториях ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (г. Воронеж),

ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (г. Москва), ПАО Молочный комбинат «Воронежский» (г. Воронеж), филиала ПАО МК «Воронежский», Калачеевский сыр-завод (г. Калач, Воронежская область). В ходе эксперимента определение активности плазмينا проводили согласно спектрофотометрическому методу.

Полученные экспериментальные данные были проанализированы с помощью Microsoft Excel и Statsoft Statistica. Обработку данных экспериментов проводили методами математической статистики по 5–10 опытов в трехкратной последовательности. Графические зависимости на рисунках представлены после обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов. Нормальное распределение переменных по каждому показателю было определено с использованием кри-

терия Шапиро-Уилка. Полученные результаты выражены как среднее $\pm$ стандартное отклонение и медиана (минимальное значение $\sim$ максимальное значение) для данных с нормальным и ненормальным распределением соответственно. Доверительный интервал – $P > 0,95$ при условии, что рассчитанные величины были значимыми.

Активность плазмينا определяли по расщеплению хромогенного субстрата как количество плазмينا или активированного урокиназой плазминогена, которое вызывало изменение поглощения при 450 нм на 0,001 за 1 мин при pH 7,4 и 37 °C. Принцип метода заключается в том, что при расщеплении нитроанилидного субстрата высвобождается п-нитроанилин, количество которого определяют спектрофотометрически по величине абсорбции при 405 нм (рис. 2) [17].

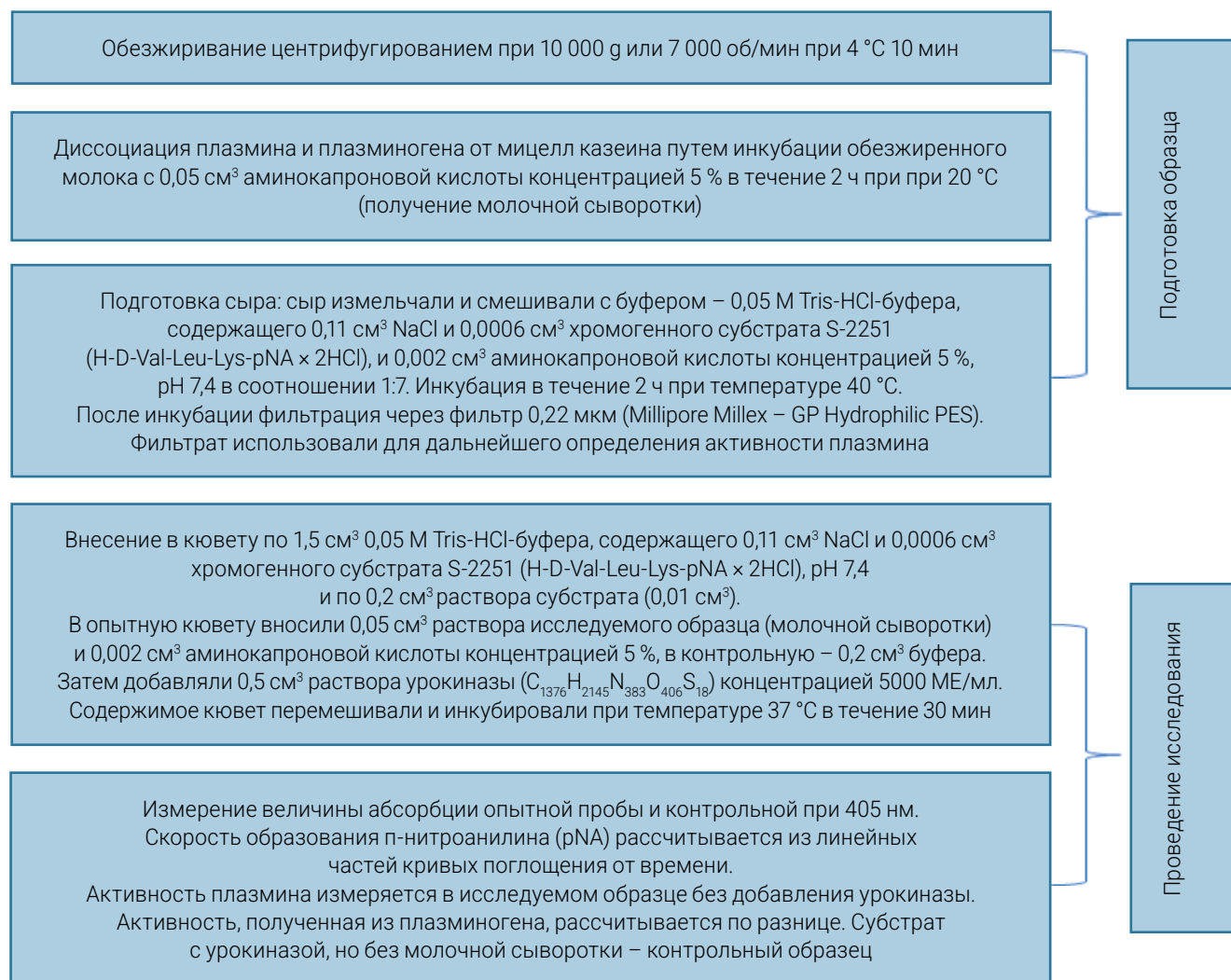


Рисунок 2. Методика определения активности плазмينا по расщеплению хромогенного субстрата

Активность плазмينا ($A_{пл}$, ед/см³) определяли по формуле:

$$A_{пл} = \frac{V}{v \times E_{405} \times d} \Delta A / \text{мин}$$

где V – объем смеси; v – объем образца (0,2 см³); E_{405} – коэффициент абсорбции п-нитроанилина ($E_{405} = 10,4 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$); d – длина оптического пути (1 см); $\Delta A / \text{мин}$ – изменения абсорбции в минуту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

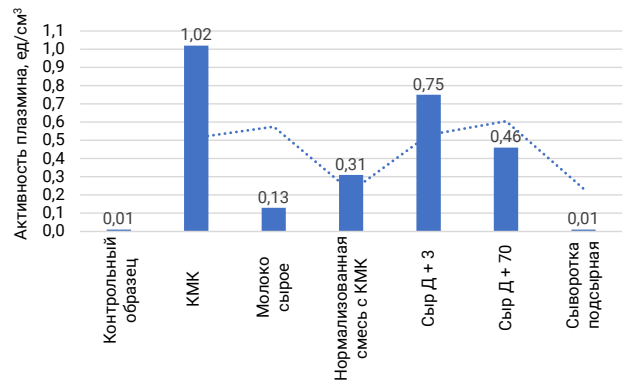
При производстве сыров важным технологическим этапом является нормализация смеси по массовой доле жира и массовой доле белка. Коэффициент нормализации важен при производстве сыров твердой группы. Нормализация по массовой доле белка концентратом мицеллярного казеина способствует изменению соотношения между казеином и сывороточными белками в сторону увеличения содержания казеиновых фракций, а следовательно, их переходу в белковый сгусток. При этом возможно возникновение технологических рисков, связанных с увеличением содержания ферментов системы «плазмин – плазминоген», способных участвовать в протеолизе сырной массы [18].

Количественное определение плазмينا установило, что максимальная активность фермента наблюдалась в сыре на третьи сутки созревания, в отличие от концентрата мицеллярного казеина, контрольного образца и сыворотки подсырной. В конце созревания на 70 сутки наблюдалось снижение активности фермента (рис. 3, табл. 1).

Исследование влияния активности плазмينا на гидролиз казеина показало, что активность плазмينا увеличивается в концентрате мицеллярного казеина, а также в сыре на третий день созревания с концентратом мицеллярного казеина, что приводит к ускорению созревания и изменению текстурных характеристик сыра. По окончании созревания



Источник изображения: magnific.com



Примечание: КМК – концентрат мицеллярного казеина.

Рисунок 3. Изменение активности ферментной системы «плазмин – плазминоген» в образцах

Таблица 1. Активность плазмينا, плазминогена в исследуемых образцах при pH 7,4 и 37 °C

Показатель	Наименование исследуемого образца	Контрольный образец	КМК	Молоко сырое	Нормализованная смесь с КМК	Сыр Д + 3 с КМК	Сыр Д + 70 с КМК	Сыворотка подсырная
Массовая доля белка, %		0	12,00	3,34	4,0	32,68	36,40	0,65
Активность плазмينا, ед/см³		< 0,01	1,02	0,13	0,31	0,75	0,460	< 0,01
Активность плазминогена, ед/см³		0,02	8,34	1,25	5,66	5,85	5,47	0,03

Примечание: КМК – концентрат мицеллярного казеина.

Таблица 2. Аминокислотный состав в твердом сыре на 70 день созревания, мг/100 г

Наименование показателя	Сыр Д + 70 с КМК	Сыр Д + 70 (контрольный образец)
Триптофан	265,3 ± 20,0	547,4 ± 20,0
Глутамин + глутаминовая кислота	7813,5 ± 20,0	4735,2 ± 20,0
Аспарагин + аспарагиновая кислота	2896,7 ± 20,0	1816,8 ± 20,0
Цистин	272,2 ± 24,0	123,3 ± 24,0
Аргинин	641,7 ± 23,0	587,1 ± 23,0
Лизин	1834,8 ± 18,0	1025,8 ± 18,0
Тирозин	1211,2 ± 23,0	1108,0 ± 23,0
Фенилаланин	1374,0 ± 23,0	1074,6 ± 23,0
Гистидин	679,3 ± 23,0	572,4 ± 23,0
Лейцин + изолейцин	3627,9 ± 18,0	3145,1 ± 18,0
Метионин	2103,4 ± 23,0	547,4 ± 23,0
Валин	1369,3 ± 18,0	1404,3 ± 18,0
Пролин	2916,7 ± 18,0	2497,1 ± 18,0
Треонин	997,8 ± 18,0	944,3 ± 18,0
Серин	1442,5 ± 18,0	781,0 ± 18,0
Аланин	772,1 ± 18,0	751,2 ± 18,0
Глицин	513,4 ± 18,0	490,0 ± 18,0
Итого	30 791,80	22 673,00

Примечание: КМК – концентрат мицеллярного казеина.

сыра наблюдалось снижение активности фермента, что свидетельствует о высвобождении аминокислот из пептидов. Результаты исследования показывают, что фермент остается связным с белковым матриксом и не переходит в подсырную сыворотку.

Скорость высвобождения аминокислот в сыре, выработанный с применением концентрата мицеллярного казеина, выше. Анализ содержания свободных аминокислот (табл. 2) позволил определить, что при производстве твердых сыров с высокой температурой второго нагревания нативный фермент плазмин совместно с ферментами, продуцируемыми заквасочными микроорганизмами, обеспечили более глубокий протеолиз с образованием аминокислот (их в 1,35 раз больше, чем пептонов), что позволило в равных условиях сократить сроки созревания сыров на 18–22 %.

Выводы

Интенсификация технологических процессов способствует росту производственных мощностей за счет повышения выхода готового продукта при увеличении содержания казеиновых фракций при производстве твердых сычужных сыров. Одно из

направлений, позволяющих реализовать данную стратегию, – оценка активности нативных ферментов в нормализованных смесях для производства твердого сыра, а также исследование их влияния на компоненты сухого вещества по всему технологическому процессу переработки. Проведенные исследования установили целесообразность применения спектрофотометрического метода контроля активности нативных ферментов системы «плазмин – плазминоген» в нормализованных смесях с концентратом мицеллярного казеина, сыворотке и готовом продукте. Доказано, что плазмин обеспечивает более глубокий протеолиз казеина во время созревания твердого сыра. Это подтверждается увеличением на 34–38 % содержания свободных аминокислот в образце сыра с высокой температурой второго, нагревания с концентратом мицеллярного казеина в сравнении с контрольным образцом. Таким образом продолжительность созревания сыра сокращается на 18–22 %. Применение адаптированного спектрофотометрического метода анализа активности плазмينا в нормализованных смесях при производстве твердого сыра также позволит корректировать технологические режимы для получения стандартного по физико-химическим показателям готового продукта. ■

Поступила в редакцию: 06.04.2026

Принята в печать: 15.09.2026

MEASURING THE ACTIVITY OF NATIVE PLASMIN ENZYME IN MILK AND MILK SOURCES

Elena I. Melnikova, Maria S. Chekmareva, Ekaterina V. Bogdanova

Voronezh State University of Engineering Technologies, Voronezh, Russia

ORIGINAL ARTICLE

Abstract. During the casein hydrolysis that occurs as hard cheese ripens, plasmin can alter the properties of the casein network, the ripening rate, and the texture of the final product. This research featured a model mixture of micellar casein concentrate, high-scald cheese curd, and whey. Spectrophotometry was used to determine the activity of the native plasmin–plasminogen enzyme system, as well as the effect of these enzymes on cheese curd proteolysis. The plasmin activity in the micellar casein concentrate and the experimental cheese sample was higher than that of the control sample on the third day of ripening. By the end of the ripening period, the experimental cheese demonstrated a decrease in enzyme activity, indicating the release of amino acids from peptides, while the enzyme remained bound to the protein matrix and did not migrate into the whey. The rate of amino acid release in the cheese with micellar casein concentrate was 1.35 times higher, potentially allowing for a 20% reduction in cheese ripening time. Spectrophotometry proved effective in monitoring the plasmin–plasminogen enzyme system activity in cheesemaking, making it possible to achieve target technological parameters and optimize production processes.

Keywords: hard cheeses, micellar casein concentrate, plasmin activity, microstructure, spectrophotometry

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vélez, M. A. Plasmin and coagulant activities in a minicurd model system: Study of technological parameters / M. A. Vélez [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2016. Vol. 99(9). P. 7053–7062. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10799>
2. Korycka-Dahl, M. Plasmin activity in milk / M. Korycka-Dahl [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 1983. Vol. 66(4). P. 704–711. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81848-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81848-7)
3. Castellino, F. J. Rabbit plasminogen and plasmin isozymes / F. J. Castellino, J. M. Sodetz // *Methods in Enzymology*. 1976. Vol. 45. P. 273–286. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(76\)45026-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(76)45026-7)
4. Heegaard, C. W. The plasminogen activation system in bovine milk: Differential localization of tissue-type plasminogen activator and urokinase in milk fractions is caused by binding to casein and urokinase receptor / C. W. Heegaard, L. K. Rasmussen, P. A. Andreasen // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1994. Vol. 1222(1). P. 45–55. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90023-X)
5. Farkye, N. Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin / N. Farkye, P. F. Fox // *Journal of Dairy Research*. 1992. Vol. 59(2). P. 209–216. <https://doi.org/10.1017/S0022029900030454>
6. Лепилкина, О. В. Ферментативный протеолиз при преобразовании молока в сыр / О. В. Лепилкина, А. И. Григорьева // *Пищевые системы*. 2023. Т. 6, № 1. С. 36–45. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45>; <https://elibrary.ru/mysjff>
7. Gazi, I. Plasmin activity and proteolysis in milk protein ingredients / I. Gazi, I. C. Vilalva, T. Huppertz // *International Dairy Journal*. 2014. Vol. 38(2). P. 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.11.012>
8. Haïssat, S. Quantitative characterization of bovine plasminogen binding to caseins / S. Haïssat [et al.] // *Analytical Biochemistry*. 1994. Vol. 222(1). P. 472–478. <https://doi.org/10.1006/abio.1994.1519>
9. Alichanidis, E. Heat stability of plasmin (milk proteinase) and plasminogen / E. Alichanidis, J. H. M. Wrathall, A. T. Andrews // *Journal of Dairy Research*. 1986. Vol. 53(2). P. 259–269. <https://doi.org/10.1017/S0022029900024869>
10. Srinivasan, M. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels / M. Srinivasan, J. A. Lucey // *Journal of Dairy Science*. 2002. Vol. 85. P. 1070–1078. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74167-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74167-2)
11. Salunke, P. Microfiltration and ultrafiltration process to produce micellar casein and milk protein concentrates with 80% crude protein content: Partitioning of various protein fractions and constituents / P. Salunke, C. Marella, L. E. Metzger // *Dairy*. 2021. Vol. 2. P. 367–384. <https://doi.org/10.3390/dairy2030029>
12. Carter, B. G. Microfiltration-derived casein and whey proteins from milk / B. G. Carter [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2021. Vol. 104(3). P. 2465–2479. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18811>
13. Hammam, A. R. A. Production and storage stability of concentrated micellar casein / A. R. A. Hammam, S. L. Beckman, L. E. Metzger // *Journal of Dairy Science*. 2022. Vol. 105. P. 1084–1098. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21200>
14. Melnikova, E. I. Technological Parameters of Microfiltration in the Production of Micellar Casein Concentrate / E. I. Melnikova, E. B. Stanislavskaya, E. V. Bogdanova // *Current Nutrition & Food Science*. 2024. Vol. 20(4). Art. no. P. 520–528. <https://doi.org/10.2174/0115734013266503230919071431>
15. Hammam, A. R. A. Manufacture of process cheese products without emulsifying salts using acid curd and micellar casein concentrate / A. R. A. Hammam, R. Kapoor, L. E. Metzger // *Journal of Dairy Science*. 2022. Vol. 106(1). P. 117–131. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22379>
16. Hammam, A. R. A. Manufacture of culture-based acid curd using micellar casein concentrate / A. R. A. Hammam, L. E. Metzger // *Journal of Dairy Science*. 2020. Vol. 103(1). P. 129–130.
17. Dupont, D. Differential titration of plasmin and plasminogen in milk using sandwich ELISA with monoclonal antibodies / D. Dupont [et al.] // *Journal of Dairy Research*. 1997. Vol. 64(1). P. 77–86. <https://doi.org/10.1017/S0022029996001938>
18. Aaltonen, T. Effect of microfiltration of milk on plasmin activity / T. Aaltonen, P. Ollikainen // *International Dairy Journal*. 2011. Vol. 21(4). P. 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.12.002>