

*Л.Л. Богданова, к.т.н., В.В. Ковалева, А.Д. Белокобылова  
Институт мясо-молочной промышленности, Минск, Республика Беларусь*

## **ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛИЗОЦИМА МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ СЫРОВ. АНАЛИЗ СОВРЕМЕННОГО РЫНКА ПРЕПАРАТОВ ЛИЗОЦИМА**

*L. Bahdanava, V. Kovaleva, A. Belokobylova  
Institute for Meat and Dairy Industry, Minsk, Republic of Belarus*

## **STUDY OF THE POSSIBILITY OF USING LYSOZYME OF MICROBIAL ORIGIN IN THE PRODUCTION OF CHEESE. ANALYSIS OF THE MODERN MARKET FOR LYSOZYME DRUGS**

*e-mail: bogdanova\_ll@tut.by, viktoriakovaleva000@gmail.com, nastya.belokobylova@mail.ru*

*В статье представлен анализ особенностей применения лизоцима в сыроделии, а также современного рынка препаратов лизоцима; отбор препаратов лизоцима для проведения научных исследований.*

*The article presents an analysis of the features of the use of lysozyme in cheese making, as well as the modern market for lysozyme preparations.*

**Ключевые слова:** микробный лизоцим; лизис клеток; антимикробные препараты.

**Key words:** microbial lysozyme; cell lysis; antimicrobial drugs.

**Введение.** Перспективным направлением в пищевой промышленности является использование различных ферментов, которые в свою очередь способствуют оптимизации технологических процессов, повышению выхода, а также улучшают качество готовых продуктов. Ежегодно на рынке ферментов появляются новые препараты, обладающие различной специфической активностью. Это связано с интенсивным изучением возможности использования различных микроорганизмов для получения энзимов.

Наиболее масштабно используют ферментные препараты микробного происхождения в спиртовой и пивоваренной (порядка 60% от общего объема ферментных препаратов), хлебопекарной, кондитерской, крахмало-паточной, сыродельной (до 20%) отраслях промышленности [1–2].

Ферменты в молочной отрасли используются давно. На сегодняшний день имеется большой ассортимент молокосвертывающих ферментов, имеющих микробиологическое происхождение, в том числе полученных с использованием инструментов генной модификации. Также в отрасли используются липазы, некоагулирующие протеазы, аминопептидазы, лактазы, лизоцим, трансферазы и другие энзимы.

Значимую роль играют ферменты, которые обеспечивают безопасность пищевых продуктов, так как одной из ключевых проблем безопасности пищевых продуктов является микробиологическое загрязнение, наличие микроорганизмов, вызывающих порчу [1, 3–7].

Совершенствование способов использования и расширение ассортимента

антимикробных препаратов для защиты пищевых продуктов от развития посторонней микрофлоры является одной из актуальных задач, стоящих перед отечественным сыроделием, и имеет большое значение для обеспечения безопасности вырабатываемых сыров, а также рентабельности сыродельных предприятий. Для подавления развития технически вредной микрофлоры (в частности, маслянокислых бактерий) в сыроделии практически на всех молокоперерабатывающих предприятиях Республики Беларусь используют лизоцим. Эффективность подавления роста маслянокислых бактерий, и, как следствие, качество и безопасность сыров зависит от исходной контаминации молока-сырья и активности применяемых препаратов лизоцима. Следует учитывать, что в определенных концентрациях лизоцим может оказывать ингибирующее действие не только на развитие маслянокислых бактерий, но и на рост и активность заквасочных культур. Данные о дозах лизоцима, которые можно использовать в сыроделии без потери активности закваски, существенно разнятся. Исследований в Республике Беларусь по оценке эффективности использования лизоцима микробного происхождения в сыроделии ранее не проводилось [2, 5–7].

**Результаты и их обсуждение.** Важным критерием для молочной промышленности, в частности сыроделия, является высокое качество сырья.

При приемке молока предприятия часто сталкиваются с проблемами контаминации сырья маслянокислыми бактериями. Особенно высокая вероятность контаминации сырья в период кормления животных силосом, так как в случаях нарушения технологии силосования имеется большая вероятность наличия в таком сырье маслянокислых бактерий.

Маслянокислые бактерии относятся к роду *Clostridium*, отсюда и их второе название – клостридии. Группа бактерий, характеризующихся способностью сбраживать сахара, соли органических кислот и, в некоторых случаях, даже белки с образованием масляной кислоты. Типичные представители – *Clostridium pasteurianum*, *C. butyricum* и *C. tyrobutyricum* – подвижные палочки величиной от 3 до 12 мкм с перитрихальным жгутованием, строгие (облигатные) анаэробы. В цитоплазме клеток содержится крахмалоподобное вещество, окрашивающееся йодом в тёмно-синий цвет (характерный признак).

Сыр является благоприятной средой для роста и размножения клостридий. В сыре достаточно питательных компонентов и созданы оптимальные (анаэробные) условия для их жизнедеятельности. Особенно проблемным для сыродела свойством клостридий является то, что они образуют споры, которые не уничтожаются пастеризацией, и потом, в процессе созревания сыра, эти споры прорастают. Впоследствии ни кислотность сыра, ни пониженная температура созревания полностью не останавливают рост и развитие клостридий: они растут при pH=4,8 и температуре 8°C. Являясь гетероферментативными микроорганизмами, в процессе своей жизнедеятельности маслянокислые бактерии продуцируют масляную кислоту и большое количество газов – углекислого газа и водорода. Этот процесс, называемый маслянокислым брожением, вызывает позднее вспучивание сыров (образование большого количества газов через три-четыре недели созревания). Это приводит к образованию «сплитов» – тонких шелевидных разрывов внутри головки сыра или, в худшем из вариантов, к разрыву головок на части и возникновению прогорклого вкуса [6].

При наличии спор клостридий в исходном сырье переработчики молока для получения продукции удовлетворительного качества вынуждены применять разнообразные технологические приемы: повышать содержание поваренной соли в сыре до 3–3,5%, использовать бактофугирование и т.д. Однако, данные методы эффективны только при условии контаминирования молока спорами клостридий в количествах, не превышающих установленных в ТНПА на сыры. Во всех остальных случаях, когда контаминация превышает норму, возникает потребность использовать

различные антимикробные препараты. При этом важно, чтобы препараты обладали высокой избирательной активностью в отношении маслянокислых бактерий, не оказывая значительного влияния на качество и себестоимость продукции, а также окружающую среду.

Для предотвращения позднего вспучивания сыров – обычно используется низин, нитрат калия E252, нитрат натрия E253 (селитра), лизоцим.

Исследованиями, проведенными в лаборатории технологий сыроделия и маслоделия РУП «Институт мясо-молочной промышленности», установлено, что использование низина оказывает негативное влияние на заквасочные микроорганизмы: при добавлении низина в нормализованную молочную смесь в количестве 0,05 г/дм<sup>3</sup> количество молочнокислых бактерий после прессования, а также 25 суток созревания было в 4,7 раза меньше, чем в контрольном варианте, после 45 суток созревания – в 2 раза меньше.

Для большинства молочных продуктов целенаправленное добавление нитратов и нитритов строго ограничено. В некоторые виды сыров добавляют нитраты в небольших количествах (20–200 мг на кг нормализованного молока) с целью ограничить позднее вспучивание и дефекты, связанные с газообразованием. Подобная практика в настоящее время рассматривается в пределах стран ЕС, России, США, в которых допускается максимальное количество – 50 мг NO<sub>3</sub><sup>-</sup> на кг готового сыра, однако запрещено к употреблению в детском питании. Нитраты в свежем сыре неустойчивы и быстро переходят в нитриты посредством ксантинооксидазы молока и разнообразных микробных нитратредуктаз во время созревания сыра. Нитрит также быстро переходит в другие сложные вещества, поэтому его содержание в сыре, как правило, невелико. Однако были ситуации, когда изготовители сыров, несмотря на соблюдение технологических правил, получали рекламации в связи с обнаружением контролирующими организациями превышения уровня допустимого содержания нитратов в готовом продукте.

Для подавления роста посторонней микрофлоры (в частности, маслянокислых бактерий) в сыроделии практически на всех молокоперерабатывающих предприятиях республики используют **лизоцим**. Лизоцим представляет собой термостабильный белок типа муколитического фермента. Он содержится в тканевых жидкостях животных и растений, у человека – в слезах, слюне, перитонеальной жидкости, плазме и сыворотке крови, в лейкоцитах, материнском молоке и др. Лизоцим имеется в продуктах, входящих в рацион человека, таких как репа, цветная капуста и зародыши пшеницы, содержится в высоких концентрациях в белке куриного яйца.

Активность лизоцима проявляется в лизисе бактериальных клеток. При этом следует отметить, что все виды бактерий отличаются различной степенью устойчивости в отношении лизоцима. Механизм действия лизоцима состоит в гидролизе связей между N-ацетилмурамовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в полисахаридных цепях пептидогликанового слоя клеточной стенки бактерии. Это приводит к изменению проницаемости клеточной стенки микроорганизмов, сопровождающемуся диффузией клеточного содержимого в окружающую среду, и гибели клеток.

Лизоцим продается на коммерческой основе крупными поставщиками молочных ингредиентов для использования в производстве сыра. На рынке промышленных ферментов доминируют пять ведущих игроков, а именно Novozymes, DuPont, Royal DSM, AB Enzymes и BASF, на долю которых приходится около 75% всего рынка. Другими признанными игроками на рынке являются Amano Enzymes, Biocatalysts, BioResource International Inc., Chr. Hansen Holding AS, Enzyme Development Corporation, Lesaffre и другие компании. В настоящее время на рынке Республики Беларусь и России предлагаются коммерческие препараты лизоцима Afilact Fluid фирмы «Chr.Hansen» (Дания), Lysozyme фирмы «CSK» (Нидерланды),

Clerizyme фирмы «Caglificio Clerici Spa» (Италия) и другие. Основные продукты и производители представлены в таблице 1:

Таблица 1 – Основные поставщики и продукты

Производитель	Торговая марка (форма выпуска)	Заявленная активность , FIP	Рекомендуемая дозировка
1	2	3	4
«Chr.Hansen» (Дания), Miltex (РБ)	AFILACT® FLUID (ж) AFILACT® INSTANT (с)	35000	10–15 см <sup>3</sup> /100 дм <sup>3</sup> молока
«DSM Food Specialties Dairy Ingredients» (Франция)	Delvozyme G (гр) Delvozyme L (ж)	9000000	2–5 г/100 дм <sup>3</sup> молока 8–20 см <sup>3</sup> /100 дм <sup>3</sup> молока
«Egg Powder Specialists (EPS) S.p.a.» (Италия)	Lysozyme Hydrochloride Liquid (ж)	45000	250–1000 см <sup>3</sup> / 10 000 дм <sup>3</sup> молока
Handary (Бельгия)	LYSOCH ®E4 (ж) LYSOCH ® G4 (с)	45000	2–2,5 г/100 дм <sup>3</sup> молока
Caglificio Clerici S.p.A., Via Marrzori, Cadorago (Como) (Италия)	CLERIZYMA	-	2 г/100 дм <sup>3</sup> молока
МАУАСАН ® Biotech. ООО «МИЛКТРИ»	Mayozyme® 9000L	9000000	10 см <sup>3</sup> /100 дм <sup>3</sup> молока
Calza Clemente s.r.l. (Италия)	Astro Liquid Lysozyme (ж) Granular Lysozyme (гр)	9000000 45000	-

Примечание: ж – жидкая форма; гр – гранулированная форма; с – сухая форма  
Источник данных: собственная разработка

Все представленные в таблице препараты изготовлены из белка куриных яиц, т.к. на сегодняшний день согласно ТР ТС 029/2012 в сыроделии допускается использование только ферментных препаратов лизоцима животного происхождения (Приложение 26 «Ферментные препараты, разрешенные для применения при производстве пищевой продукции», стр. 240).

Задачей инициированных нами исследований является формирование экспертной позиции по влиянию лизоцима микробного происхождения на заквасочную микрофлору сыра в процессе его изготовления, а также на органолептические, физико-химические и микробиологические показатели готовой продукции, а также в определении целесообразных дозировок антибактериального препарата лизоцима микробного происхождения при изготовлении сыров, что в совокупности будет способствовать улучшению качества сыров и снижению удельного веса некачественной продукции посредством предотвращения возникновения порока «позднего вспучивания» сыров, вызываемого развитием маслянокислых бактерий.

Сегодня микробный лизоцим представлен двумя препаратами компании Handary (Бельгия).

**Lysoch ® G4 (Lysoch ® L4)** – сухой (жидкий) микробный лизоцим. Производитель: Handary (Бельгия). Lysoch ® G4 – это пищевой лизоцим, полученный путем ферментации пищевых культур. Он в основном используется для лизиса грамположительных и грамотрицательных бактерий в обработанных пищевых продуктах.

Ключевые качества для производителей продуктов питания:

– помогает снизить риски для безопасности пищевых продуктов за счет борьбы с такими патогенами, как *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Salmonella*;

– можно использовать до или после термообработки (высокая термоустойчивость);

– обеспечивает высокие органолептические качества готового продукта и экономичность использования (низкая дозировка).

Основные преимущества для потребителей:

– натуральный, безопасный антимикробный фермент для повышения безопасности пищевых продуктов;

– удовлетворяет потребительские потребности в продуктах питания, защищенных натуральными ингредиентами, путем полной или частичной замены химических антибиотиков, нитратов и нитритов.

Продукт выпускается в двух формах: прозрачная жидкость (ж) и сухой порошок (п). Состав:  $\geq 2,5\%$  лизоцим,  $< 97,5\%$  вода (ж);  $\geq 95\%$  (п). рН составляет 2,5–4,5 для жидкой формы, 2,5–4,5 (2% водного раствора при 20–25°C) для порошка соответственно. Активность:  $\geq 1,5 \times 10^6$  FIP ME/cm<sup>3</sup>.

Новая технология получения бактериального лизоцима: селекция *Streptomyces ssp.* штамм G4 с помощью УФ-мутагенеза позволила выявить наилучшие условия для роста штамма. Это привело к значительному снижению производственных затрат (на 2/3 по сравнению с производством лизоцима из яичного белка) за счет снижения энергопотребления в производственном процессе [8].

Lysoch®G4 одобрен FDA США как GRAS. Правила, регулирующие использование Lysoch®G4, значительно различаются в странах, в которых он в настоящее время одобрен. Консультация относительно правового статуса этого продукта предоставляется по запросу.

**Заключение.** В результате анализа современных требований к качеству и безопасности сыров, а также процессам их производства, определено, что общим специфическим показателем качества молока-сырья, установленным в ТНПА на различные виды сыров, является содержание спор мезофильных анаэробных лактатсбраживающих бактерий. Эффективным средством предупреждения маслянокислого брожения сыра является лизоцим.

Проведен научный анализ современного рынка ферментных препаратов микробного лизоцима и лизоцима, полученного из белка куриных яиц.

Изучен ассортиментный состав и проведена сравнительная характеристика различных ферментных препаратов лизоцима. Установлено, что на рынке промышленных ферментов доминируют пять ведущих игроков, а именно Novozymes, DuPont, Royal DSM, AB Enzymes и BASF, на долю которых приходится около 75% всего рынка. Выпускаются следующие формы коммерческих препаратов лизоцима: жидкая, сухая и гранулированная.

Установлено, что в составе коммерческих препаратов лизоцимов, выделенных из белка куриных яиц, лизоцим представлен в виде гидрохлорида (солевая форма); микробный лизоцим выделяют из генно-модифицированных штаммов микроорганизмов.

На основании научного анализа проведен отбор ферментных препаратов микробного лизоцима для научных исследований, в результате которого выбраны: Lysoch® G4 (сухая форма) и Lysoch®L4 (жидкий), производитель: Handary, Бельгия.

### Список использованных источников

1. Римарева Л. В., Серба Е. М., Соколова Е. Н., Борщева Ю. А., Игнатова Н. И. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопр. питания. – 2017. – Т. 86. – № 5. – С. 62–74.

1. Rimareva L. V., Serba E. M., Sokolova E. N., Borshheva Ju. A., Ignatova N. I. Fermentnye preparaty i biokataliti-cheskie processy v pishhevoj promysh-lennosti [Enzyme preparations and biocatalytic processes in the

2. Яшкин А. И. Современные подходы к применению микробной трансклутаминазы в сыроделии (аналитический обзор) // Молочнохозяйственный вестник. – I кв. – 2019. – №1 (33). – С. 98–113.
3. Ферменты в пищевой промышленности / Р. Дж. Уайтхерст (ред.), М. ван Оорт (ред.). – СПб. : Профессия, 2013. – 408 с.
4. Whitehurst, R. J., and van Oort, M. “Enzymes in Food Technology” 2nd ed. West Sussex : Wiley-Blackwell, 2010.
5. Богданова Л. Л., Фролов И. Б. Изучение эффективности использования антимикробных и фунгицидных препаратов в сыроделии. Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья, 2014 ; 1(9) : С. 77–82.
6. Снеговая, Н. В. Качество продукции. Анаэробные бактерии – угроза в вакууме / Н. В. Снеговая // Пищевая индустрия. – №4. – 2018. – С. 36–37.
7. Whitehurst, R. J., and van Oort, M. “Enzymes in Food Technology” 2nd ed. West Sussex : Wiley-Blackwell. 2010.
8. Handary | Natural shelf life specialist. – [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.handary.com/>. – Date of access: 23.10.2023.
2. Jashkin A. I. Sovremennye podhody k primeneniju mikrobnj transgljutaminazy v syrodellj (analiticheskij obzor) [Modern approaches to the use of microbial transglutaminase in cheese making] // Molochnohozjajstvennyj vestnik. – I kv. – 2019. – №1 (33). – S. 98–113.
3. Fermenty v pishhevoj promyshlennosti [Enzymes in the food industry] / R. Dzh. Uajtherst (red.), M. van Oort (red.). – SPb. : Professija, 2013. – 408 s.
5. Bogdanova L. L., Frolov I. B. Izuchenie jeffektivnosti ispol'zovanija antimikrobnyh i fungicidnyh preparatov v syrodellj [Studying the effectiveness of using antimicrobial and fungicidal drugs in cheese making]. Aktual'nye voprosy pererabotki mjasnogo i molochnogo syr'ja, 2014 ; 1(9) : S. 77–82.
6. Snegovaja, N. V. Kachestvo produkcii. Anajerobnye bakterii – ugroza v vakuume [Product quality. Anaerobic bacteria are a threat in a vacuum] / N. V. Snegovaja // Pishhevaja industrija. – №4. – 2018. – S. 36–37.
- food industry] // Vopr. pitanija. – 2017. – T. 86. – № 5. – S. 62–74.