

DOI: <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45>

Поступила 16.02.2023

Поступила после рецензирования 09.03.2023

Принята в печать 14.03.2023

© Лепилкина О. В., Григорьева А. И., 2023



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

Обзорная статья

Open access

# ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ПРОТЕОЛИЗ ПРИ ПРЕОБРАЗОВАНИИ МОЛОКА В СЫР

Лепилкина О. В.\*, Григорьева А. И.

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

## КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:

молоко, сыр, протеолиз, плазмин, ферменты молочнокислых бактерий, сычужный фермент

## АННОТАЦИЯ

Преобразование молока в сыр происходит под влиянием множества физико-химических, биохимических и микробиологических процессов, среди которых протеолизу отводится очень важная роль. Протеолиз относится к наиболее сложному типу необратимой посттрансляционной модификации белков. Катализаторами ферментативного протеолиза на разных стадиях производства сыра являются нативные ферменты молока, экзо- и эндопептидазы заквасочных и не заквасочных микроорганизмов, молокосвертывающие ферменты. В статье представлен краткий обзор современных представлений о свойствах, механизме действия и специфичности основных представителей ферментов, гидролизующих молочные белки на стадиях подготовки молока к свертыванию, во время сычужного свертывания и последующего созревания сыров. К ним относятся плазминовая система молока, ферменты психротрофных бактерий и молочнокислых микроорганизмов, попадающих в молоко как случайно (незаквасочная микрофлора), так и планируемо в виде заквасок из специально подобранных штаммов. Мокосвертывающие ферменты, выполнив свою основную функцию — свертывание молока, — частично переходят в сыр и наряду с ферментами заквасочных микроорганизмов и плазмином участвуют в протеолитических процессах при созревании сыра. Общеизвестно, что протеолиз в созревающих сырах является наиболее значимым биохимическим процессом, влияющим на формирование вкуса, аромата и консистенции наряду с липолизом и гликолизом. Сочетание продуктов протеолиза (пептидов, аминокислот, аминов и др.) индивидуально для разных видов сыров и меняется в зависимости от технологических параметров изготовления, в том числе от продолжительности созревания. Протеолиз в сырах исследовался многими учеными в различных аспектах. Этот обзор дополняет известные сведения новой информацией, не претендуя на всеобъемлемость.

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 16.02.2023

Accepted in revised 09.03.2023

Accepted for publication 14.03.2023

© Lepilkina O. V., Grigorieva A. I., 2023

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

Review article

Open access

# ENZYMATIC PROTEOLYSIS DURING THE CONVERSION OF MILK INTO CHEESE

Olga V. Lepilkina\*, Anastasija I. Grigorieva

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

## KEY WORDS:

milk, cheese, proteolysis, plasmin, lactic acid bacteria enzymes, rennet

## ABSTRACT

The transformation of milk into cheese occurs under the influence of many physicochemical, biochemical and microbiological processes, among which proteolysis plays a very important role. Proteolysis belongs to the most complex type of irreversible post-translational modification of proteins. Enzymatic proteolysis catalysts at different stages of cheese production are native milk enzymes, exo- and endopeptidases of starter and non-starter microorganisms, and milk-clotting enzymes. The article presents a brief overview of modern ideas about the properties, mechanism of action and specificity of the main representatives of enzymes that hydrolyze milk proteins at the stages of preparing milk for coagulation, during rennet coagulation and subsequent maturation of cheeses. These include the plasmin system of milk, enzymes of psychrotrophic bacteria and lactic acid microorganisms that enter milk both accidentally (non-starter microflora) and planned in the form of starter cultures from specially selected strains. Milk-clotting enzymes, having fulfilled their main function — milk coagulation — partially pass into cheese and, along with enzymes of starter microorganisms and plasmin, participate in proteolytic processes during cheese ripening. It is generally accepted that proteolysis in ripening cheeses is the most significant biochemical process that affects the formation of taste, aroma and texture along with lipolysis and glycolysis. The combination of proteolysis products (peptides, amino acids, amines, etc.) is individual for different types of cheese and varies depending on the technological parameters of production, including the duration of maturation. Proteolysis in cheeses has been studied by many scientists in various aspects. This review supplements the known information with new information, without claiming to be comprehensive.

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.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Лепилкина, О. В., Григорьева, А. И. (2023). Ферментативный протеолиз при преобразовании молока в сыр. *Пищевые системы*, 6(1), 36-45. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45>

FOR CITATION: Lepilkina, O. V., Grigorieva, A. I. (2023). Enzymatic proteolysis during the conversion of milk into cheese. *Food Systems*, 6(1), 36-45. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2023-6-1-36-45>

## 1. Введение

Наиболее ценной составной частью молока являются белки, разнообразные по строению, физико-химическим свойствам и биологическим функциям. Молочный протеом чрезвычайно сложен, он отличается высокой гетерогенностью из-за многочисленных генетических вариантов и изоформ [1]. На протеомный состав молока существенное влияние оказывают вид и порода жвачных животных [2,3], а также многочисленные посттрансляционные модификации, происходящие на протяжении всего цикла жизни белков: от синтеза в вымени лактирующего животного до процесса пищеварения в желудочно-кишечном тракте человека [4].

Молочные белки принято делить на две основные группы: казеины и сывороточные белки [5,6]. Российские исследователи выделяют третью группу — белки оболочек жировых глобул [7].

Казеины составляют около 80% белков молока. Они представлены четырьмя фракциями:  $\alpha_{s1}$ -казеин,  $\alpha_{s2}$ -казеин,  $\beta$ -казеин и  $\kappa$ -казеин. Приблизительное соотношение фракций казеина в общем количестве казеиновых белков: 38%  $\alpha_{s1}$ -казеина, 10%  $\alpha_{s2}$ -казеина, 35%  $\beta$ -казеина и 12%  $\kappa$ -казеина [5]. Есть мнение о гораздо большей гетерогенности казеинов, обнаруженной с помощью электрофореза в крахмальном или полиакриламидном геле. Она объясняется небольшими различиями в одном или нескольких казеинах. Эти незначительные вариации, называемые микрогетерогенностью, обусловлены пятью факторами: изменчивостью степени фосфорилирования, генетическим полиморфизмом, количеством дисульфидных связей, различиями в степени гликозилирования, гидролизом первичных казеинов плазмином [8,9].

Сывороточные белки, на долю которых приходится около 20% общего белка коровьего молока, также являются неоднородной фракцией. Суммарную фракцию сывороточных белков получают после выделения из молока казеина. Для этого используются разные способы: изоэлектрическое осаждение при pH 4,6, высаливание в насыщенном растворе NaCl или сычужное свертывание. Сывороточные белки, полученные этими методами, несколько различаются: кислая сыворотка содержит протеозопептоны, а сычужная — гликомакропептиды, образующиеся из  $\kappa$ -казеина при воздействии на него сычужного фермента. В сыворотке, полученной после осаждения казеина насыщенным раствором NaCl, не содержатся иммуноглобулины, так как они соосаждаются с казеинами. В кислой сыворотке четко определены две группы белков: лактальбумины и лактоглобулины. Лактоглобулиновая фракция представлена в основном иммуноглобулинами. Фракция лактальбумина содержит два основных белка:  $\alpha$ -лактальбумин и  $\beta$ -лактоглобулин. Кроме того в ней содержатся несколько второстепенных белков, включая альбумин сыворотки крови и лактоферрин [5].

Белки, содержащиеся в оболочках жировых глобул, составляют всего 1–2% от общего количества белков коровьего молока, но на их долю приходится 25–70% от всех веществ, входящих в состав оболочечного вещества [10]. Современными методами протеомики выявлено более 100 белков в оболочках жировых глобул [11]. К основным, присутствующим в высоких концентрациях, относятся бутирофилин, ксантиндегидрогеназа/оксидаза, адипофиллин, муцин-1, белок PAS III или муцин-15, белок CD36, белки PAS6/7 и белок, связывающий жирные кислоты. Кроме того, с оболочками жировой глобулы ассоциировано не менее 25 минорных белков [11,12]. К ним относятся ферменты, иммуноглобулины, белки цитоплазмы секреторно-

эпителиальных клеток, компоненты обезжиренного молока, белки молочных лейкоцитов [10].

Белкам присуща способность к различным межмолекулярным и внутримолекулярным взаимодействиям. В процессе преобразования молока в тот или иной молочный продукт они подвергаются многочисленным посттрансляционным модификациям. Это происходит под влиянием различных физических, химических и биохимических факторов, воздействующих на химические связи в молекуле белка. При разрыве внутримолекулярных связей (водородных, электростатических, дисульфидных) происходит денатурация белка: меняется его конформация. В случае разрыва ковалентных пептидных связей главной цепи белковой молекулы происходит ее распад на фрагменты с меньшей молекулярной массой. Это может быть достигнуто путем химического (кислотного, щелочного) или ферментативного гидролиза — протеолиза, представляющего собой сложный тип необратимой посттрансляционной модификации белков [13].

При изготовлении сыра особую роль играет ферментативный протеолиз. Он способствует текстурным изменениям сырной матрицы вследствие разрушения белковой сети, снижения активности воды за счет связывания воды высвободившимися карбоксильными и аминогруппами и повышения pH. Образующиеся при протеолизе пептиды и свободные аминокислоты напрямую влияют на вкус и запах сыра. Высвобожденные аминокислоты являются субстратом для вторичных катаболических изменений: переаминирования, дезаминирования, декарбоксилирования, десульфурации. Наряду с этим происходит катаболизм ароматических аминокислот и реакции аминокислот с другими соединениями [14].

Ферментативный протеолиз в сыре протекает под действием протеолитических ферментов — протеаз. Протеазы представляют собой большую и разнообразную группу гидролитических ферментов, которые классифицируются по их месту действия, структуре активного центра и специфическим механизмам реакции. Среди протеаз на основании их специфичности выделяют две группы: эндопептидазы (протеиназы) и экзопептидазы (пептидазы). Эндопептидазы расщепляют пептидную цепь белка в средних участках и гидролизуют ее на более мелкие фрагменты. Экзопептидазы действуют на концах пептидных цепей или вблизи них и обозначаются как аминопептидазы и карбоксипептидазы, что указывает на их действие на N- или C-концах пептидных цепей. Эти ферменты могут быть дополнительно дифференцированы в зависимости от размера отщепляемой части, будь то, например, аминокислота, дипептид или трипептид [15].

При протеолизе эндо- и экзопептидазы действуют одновременно: первые образуют большое количество «концов», от которых затем экзопептидазами отщепляются аминокислоты. Преимущественное высвобождение аминокислот происходит во время созревания сыра [16].

Следует отметить, что термины «протеазы», «протеиназы» и «пептидазы» обычно используются как синонимы к словосочетанию «протеолитические ферменты», которые расщепляют пептидные связи. Согласно «Номенклатурному комитету Международного союза биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB)», рекомендуется использовать термин «пептидаза» для любого фермента, который гидролизует пептидные связи [17].

Комплекс протеаз, действующих на протяжении всего периода изготовления сыра, представлен нативными ферментами молока, ферментами микроорганизмов закваски, молокосвертывающими ферментами, обладающими протеолитическими свойствами.

## 2. Протеолиз, катализируемый нативными ферментами молока

Начальная атака на казеин осуществляется нативными пептидазами молока, предпочтительно плазмином, переходящим из крови животного в молоко во время его синтеза в вымени. Именно в вымени начинается протеолиз отдельных фракций казеина. В результате в свежесываемом молоке присутствует протеозо-пептонная фракция белков, а также  $\gamma$ -казеин, представляющий собой фрагмент  $\beta$ -казеина. Состав протеозо-пептонов меняется в зависимости от происхождения, состояния, продолжительности и температуры хранения молока [18].

Плазмин — основная нативная протеаза молока, которая является частью сложной системы, состоящей из плазминогена, активаторов плазминогена, ингибиторов активатора плазминогена, плазмينا и ингибиторов плазмينا. Активаторы плазминогена превращают неактивный плазминоген в активный плазмин, который затем может вызвать расщепление молочных белков. Ингибиторы плазмينا, присутствующие естественным образом в молоке, могут отключать плазминовую систему [19].

В свежем молоке плазмин, плазминоген и активаторы плазминогена связаны с мицеллой казеина, что делает деградацию казеинов очень эффективной, в то время как ингибиторы системы находятся в фазе сыворотки [20]. Предполагается, что повышенная активность фермента плазмينا является вероятной причиной нарушения технологических свойств молока коров, находящихся в познелактационном периоде либо страдающих маститом [16,21].

Плазминовая система довольно термостойка. Плазмин и плазминоген выдерживают условия пастеризации молока при pH 6,8, а также являются устойчивыми к кратковременному высокотемпературному термическому воздействию [19]. При длительной пастеризации при температурах выше 80 °C плазмин теряет свою активность [18]. Ингибитор активатора плазминогена термолабилен, он инактивируется при пастеризации молока. Вследствие этого в пастеризованном молоке увеличивается протеолитическая активность плазминовой системы.

Термическая обработка молока перед изготовлением сыра также может повлиять на протеолиз во время его созревания. Снижение гидролиза казеина во время созревания сыра, приготовленного из пастеризованного молока, связано с уменьшением активности плазмينا из-за термической инактивации активаторов плазминогена и ввиду взаимодействия между  $\beta$ -лактоглобулином и компонентами плазминовой системы при нагревании [18].

Термическая инактивация плазминовой системы усугубляется под высоким давлением. Borda и др. [22] исследовали термостабильность плазминовой системы молока, полученной ультрацентрифугированием и содержащей как плазминоген, так и плазмин в фосфатном буфере при pH 6,6. В диапазоне температур от 50 до 64 °C ученые наблюдали повышение активности плазмينا, что могло быть связано с инактивацией ингибиторов плазмينا. При более высоких температурах система демонстрировала кинетику инактивации первого порядка. В процессе воздействия на систему плазмينا высокого давления было установлено, что она сохраняет устойчивость при комнатной температуре. Синергетический эффект высокого давления и температуры наблюдался в диапазоне от 300 до 600 МПа и от 35 до 65 °C. При давлении выше 600 Мпа появлялся эффект стабилизации. Авторы считают, что полученные результаты могут быть полезны для оценки применимости термических процессов при высоком давлении в производстве сыров или других молочных продуктов. При этом ученые признают

недостаток углубленных исследований структурных изменений и разрыва дисульфидных связей внутри плазмина во время комбинированной термической обработки под высоким давлением [22].

Несомненно, наблюдаемое Borda и др. [22] изменение активности плазминовой системы молока связано с трансформациями структуры и ряда физических свойств казеиновых мицелл, которые происходят под влиянием высокого давления. Так, Будкевич Р. О. и др. [23], используя метод фотонно-корреляционной спектроскопии, показали, что обработка мицелл казеина давлением приводит к трансформации их размера, что обусловлено слипанием частиц (при давлении 50 МПа), и поэтапному дроблению при дальнейшем росте давления. Это сопровождается колебаниями уровня флуоресценции тирозина и триптофана, указывая на перегруппировку молекулярной структуры казеина. ИК-Фурье спектроскопия выявила изменение интенсивности оптической плотности в диапазоне амид I, амид II и валентных связей тирозина, подтверждая отсутствие формирования новых связей. Полученные физические данные указывают на изменение структуры казеиновых мицелл с увеличением доли (25%) крупных частиц после действия высокого давления (350 МПа).

Протеолиз, катализируемый плазмином, может оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие на качество молочных продуктов. Так, в молоке, подвергнутом ультравысокотемпературной обработке, и в высокобелковых молочных напитках может произойти нежелательное гелеобразование. А в сыроделии протеолиз играет положительную роль, т.к. способствует формированию вкуса, аромата и консистенции сыров во время созревания [18,19].

О влиянии плазмينا на процесс сычужного свертывания молока имеются противоречивые сведения. Но большинство исследователей склонны считать, что плазмин влияет на этот процесс. Так, Villalobos и др. [24] было отмечено ухудшение параметров сычужного свертывания молока овец, страдающих маститом или перенесших это заболевание в предыдущую лактацию. Авторы связывают это с высокой активностью плазмينا в молоке с большим количеством соматических клеток. В этом случае ухудшались параметры сычужного свертывания из-за усиления распада казеина: увеличивалась продолжительность образования геля и уменьшалась его плотность. Но в более поздних исследованиях они не обнаружили связи между активностью плазмينا, количеством соматических клеток и параметрами процесса коагуляции [25,26]. Противоречивые результаты авторы объясняют отличиями между породами животных, а также различными методами, используемыми для измерения количества плазмينا.

Somers и др. [27] исследовали влияние активности плазмينا и холодно хранения молока на процесс сычужного свертывания при производстве сыра Моцарелла. С этой целью молоко хранили при 4 °C в течение 0, 24 и 48 часов с добавлением плазмينا и без него. В параллельных экспериментах изучали влияние инкубации молока с добавлением плазмينا в течение 2 ч при 37 °C перед пастеризацией и внесением сычужного фермента. Было установлено, что хранение в холодильнике очень мало повлияло на процесс сычужного свертывания молока. Кривые гелеобразования контрольного молока и молока, хранившегося в течение 24 и 48 ч, были практически идентичными. Но добавление экзогенного плазмينا оказало крайне негативное влияние на этот процесс, увеличивая время гелеобразования и снижая плотность образующегося геля. Эффект был наибольшим для молока, которое хранилось в течение 24 и 48 часов. Два часа выдержки при 37 °C также имели большой эффект. На основа-

нии этих результатов авторы делают вывод о том, что гидролиз казеина плазмином вреден для последующего сычужного свертывания. Вместе с тем Somers и др. [27] отмечают, что некоторые другие исследователи не обнаружили отрицательно влияния плазмينا на процесс сычужного свертывания.

Исследованиями Srinivasan и др. [21] показано, что гидролиз казеинов плазмином существенно влияет на реологические показатели гелей, полученных свертыванием молока сычужным ферментом. По мере увеличения распада казеина происходит линейное уменьшение жесткости, модуля упругости, предела текучести и линейное увеличение тангенса угла потерь ( $\delta$ ), что указывает на размягчение гелей. Даже при низких уровнях гидролиза казеина реологические свойства сычужных гелей изменялись, что могло отрицательно сказаться на выходе сыра и на его текстуре. С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии было показано, что при высоком уровне гидролиза казеина (< 40% интактных казеинов) микроструктура сычужных гелей резко изменялась [21]. Результаты этого исследования согласуются с данными, полученными Somers и др. [27] на овечьем молоке и подтверждают гипотезу о том, что повышенная активность плазмينا в молоке коров, находящихся в позднем лактационном периоде или страдающих маститом, может изменить сычужные свойства молока. При этом как отрицательный момент следует рассматривать также увеличение потерь белка с сывороткой вследствие усиленного гидролиза казеина с образованием продуктов с меньшей молекулярной массой [21].

Интересная гипотеза выдвинута Мироненко И. М. [28], которая освещает совместное действие нативных протеаз молока и ионного кальция в формировании сычужного геля. В соответствии с ней после воздействия сычужного фермента кальциевый обмен между водной фазой молока и внутримицеллярной жидкостью оказывает влияние на перевод нативных протеаз молока, локализованных в мицеллах казеина, в активное состояние. Ионный кальций активирует внутримицеллярные ферментативные процессы, вызывающие отщепление от белковых молекул концевых фрагментов, приводя белковые молекулы в реакционно-активное состояние. В частности, действие плазмينا на  $\beta$ -казеин ведет к разрыву пептидных связей с образованием  $\gamma$ -казеинов и фосфопептидов, формирующих в дальнейшем протеозопептонную фракцию подсырной сыворотки. Агрегация параказеиновых мицелл происходит за счет возникновения новых связей на их поверхности.

Логичными следует признать и выводы Мироненко И. М. [29] о том, что условия сычужного свертывания молока (рН 6,8–6,5 в диапазоне физиологических температур) являются комфортными для деятельности нативных щелочных протеаз молока. Поэтому алгоритмы их действия вполне могут быть вписаны в процесс формирования белкового геля при сычужном свертывании.

При внесении сычужного фермента в молоко плазмин и плазминоген свертываются вместе с мицеллами казеина и концентрируются в сырном зерне, переходя затем в сыр для участия в протеолизе при его созревании [29]. Вклад плазмينا в процесс созревания проявляется по-разному в сырах различных видов и зависит от таких факторов, как рН сыра во время созревания, температура свертывания молока и температура созревания сыра [18].

Плазмин действует преимущественно на  $\beta$ - и  $\alpha_{s2}$ -казеины;  $\alpha_{s1}$ -казеин менее чувствителен к гидролизу плазмином, чем  $\beta$ - и  $\alpha_{s2}$ -казеины. В результате гидролиза  $\beta$ -казеина образуются  $\gamma_1$ -,  $\gamma_2$ -,  $\gamma_3$ -казеины и протеозопептоны. При созревании сыра происходит преимущественное расщепление связи Lys<sub>21</sub>-Gln<sub>22</sub> в  $\alpha_{s2}$ -казеине. Вклад плазмينا в процесс проте-

олиза в сыре зависит от вида сыра и технологических параметров его изготовления. Например, было установлено, что активность плазмينا в сыре Эмменталь высокая, в сыре Гауда — средняя, а в Чеддере — низкая [30]. Невысокая активность плазмينا в сыре Чеддер объясняется низкими значениями рН. В сырах с высокой температурой второго нагревания типа Эмменталь плазмин, напротив, представляется важным протеолитическим агентом, так как большая часть химозина инактивируется. Плазмин, будучи термостойким ферментом, выдерживает высокую температуру второго нагревания.

Помимо плазмينا в молоке содержится несколько и других протеаз, но их влияние на протеолиз в сыре при созревании до сих пор не выявлено.

### 3. Протеолиз, катализируемый ферментами микроорганизмов

Высокая питательная ценность, высокая активность воды и почти нейтральный рН делают молоко идеальной средой для роста многих микроорганизмов [31]. В зависимости от санитарно-гигиенических условий дойки и содержания животных, методов санитарной обработки доильного и складского оборудования, состав микробиоты сырого молока может сильно отличаться в разных хозяйствах. Микробная популяция характеризует качество молока и может содержать как нежелательные (патогенные и вызывающие порчу продуктов), так и полезные (молочнокислые) микроорганизмы.

В молочной промышленности существует практика сбора и хранения молока при низких температурах до передачи на производство сыра. При низких температурах хранения (менее 7 °С) в молоке развиваются психротрофные микроорганизмы, которые продуцируют внеклеточные ферменты, в основном пептидазы и липазы [32]. В отличие от липолитических ферментов, пептидазы, как правило, чрезвычайно термостабильны и выдерживают температуры пастеризации (77 °С в течении 40 мин), а также высокотемпературную обработку молока (УНТ: 140 °С в течении 4 с) [33]. Вследствие этого в молоке, поступающем на переработку в молочные продукты, наряду с плазмином присутствуют термостабильные внеклеточные бактериальные протеиназы, продуцируемые психротрофными микроорганизмами. Большая часть (около 80%) ферментативно активных изолятов психротрофных микроорганизмов, растущих в молоке, относятся к роду *Pseudomonas* [34].

Бактериальные пептидазы психротрофных микроорганизмов различаются по своей специфичности в отношении молочных белков и влияют на систему плазмينا, что может повлиять впоследствии на качество молочных продуктов. Они проявляют активность в широком диапазоне рН и температуры. Температурные оптимумы находятся в диапазоне 30–45 °С, но и при более низких температурах пептидазы психротрофных микроорганизмов частично остаются активными. Термостабильные пептидазы психротрофов атакуют все формы казеина с преимущественным гидролизом  $\kappa$ -казеина, затем  $\beta$ -казеина и, наконец,  $\alpha$ -казеина [35]. Гидролиз  $\kappa$ -казеина может привести к дестабилизации мицелл казеина и к образованию пептидов, имеющих горький вкус. Помимо вкусовых пороков пептидазы психротрофных микроорганизмов могут стать причиной гелеобразования в стерилизованном и ультрапастеризованном молоке при длительном хранении, а также вызывать текстурные дефекты сыра и других молочных продуктов [36].

К полезным микроорганизмам сырого молока относятся молочнокислые бактерии, которые попадают в молоко с поверхностей вымени, доильного оборудования и емкостей

для хранения из окружающей среды молочного предприятия [37]. Это так называемая аутохтонная микрофлора, постоянно обитающая на данном, конкретном предприятии. Следует отметить, что при производстве некоторых видов сыров, изготавливаемых из сырого молока, используются натуральные закваски с неконтролируемым составом молочнокислых микроорганизмов, различным на разных предприятиях. Аутохтонные молочнокислые бактерии играют важную роль в производстве и формировании органолептических показателей сыров из сырого молока, являясь основными участниками биохимических процессов: протеолиза, липолиза, гликолиза.

Pogačić и др. [38], изучили разнообразие и динамику штаммов типичных молочнокислых бактерий, попадающих в сыр Grana Padano из сырого молока и натуральной сывороточной закваски, во время его созревания. Сыры были изготовлены на шести различных предприятиях северной Италии. Установлено, что в состав микробиоты сыров входили 11 видов микроорганизмов: *St. thermophilus*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lc. Lactis*, *Pc. acidilactici*, *E. faecalis*, *Lb. paraplantarum*. Молочнокислые бактерии в основном были представлены *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* и *Pediococcus acidilactici*. При этом структура и динамика микробиоты в разных местах производства сыра были специфичны.

Во многих длительно созревающих сырах из сырого молока незаквасочные молочнокислые организмы доминируют и способствуют более глубокому созреванию сыров. Как правило, сыры, изготовленные из сырого молока, обладают более интенсивным вкусом, чем сыры из пастеризованного молока [39].

После пастеризации в молоке остается небольшое количество молочнокислых микроорганизмов (0–76 КОЕ/мл), но они быстро растут в сыре при созревании. Поэтому определение пределов колониеобразующих единиц незаквасочных молочнокислых бактерий в молоке должно быть разумным для выбора соответствующего качества сырого молока для производства сыра [40].

При оптимальном содержании молочнокислая микрофлора сырого молока играет положительную роль в созревании сыра, влияя на формирование его органолептических характеристик. Но она относится к незаквасочной микрофлоре, неконтролируемое развитие которой не позволяет получать сыры стабильного качества. Поэтому в сыроделии для поддержания типичности отдельных видов сыров используют закваски с отобранными штаммами и заданными технологическими характеристиками.

Интересно отметить, что промышленные закваски для большинства сыров основаны на одном виде, а именно на *Lactococcus lactis*. Существует много штаммов этого вида, используемых для производства различных видов сыра. Они обладают разными характеристиками, но общими биохимическими признаками: способностью продуцировать кислоту и преобразовывать молочный белок во вкусовые компоненты. Во время созревания сыра протеолиз считается самым важным процессом для получения желаемого вкуса и текстуры. Лактококки обладают протеолитической системой, которая вместе с другими ферментами (химозином, пепсином) гидролизуют казеин с образованием пептидов и аминокислот. Аминокислоты затем под действием ферментов превращаются в альдегиды, спирты, кетоны, амины, кислоты, сложные эфиры и серосодержащие соединения, которые вносят свой вклад во вкус и аромат сыра. И во всех этих превращениях участвуют *Lactococcus lactis* [39].

*Lactococcus lactis* — одна из самых известных молочнокислых бактерий, ставшая парадигмой с точки зрения понимания протеолиза и утилизации пептидов. Эта бактерия требовательна к питательным веществам. Например, большинство штаммов *L. lactis* являются ауксотрофными по нескольким аминокислотам: изолейцину, лейцину, валину, глутаминовой кислоте, гистидину и метионину [41]. Количество свободных аминокислот и компонентов азота в молоке в форме, непосредственно поглощаемой бактериями для молочнокислого брожения, недостаточно, поэтому молочнокислые бактерии должны получать эти ингредиенты путем разложения молочных белков, в основном казеина с помощью протеолитических ферментов [42].

Закваски, применяемые для производства сыров, состоят из нескольких видов молочнокислых бактерий. Помимо *Lactococcus lactis* в состав первичных заквасок входят *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и *L. helveticus* [43].

Способность активно продуцировать протеолитические ферменты является одним из критериев отбора штаммов молочнокислых бактерий в состав заквасок для производства ферментированных пищевых продуктов, в том числе сыров. Эти ферменты играют важную роль в снабжении бактериальных клеток соединениями азота, а именно свободными аминокислотами, необходимыми для их роста и развития [44].

Протеолитические ферменты синтезируются внутри бактериальных клеток и в основном секретируются вне клетки. Бактериальная протеиназа, связанная с клеточной стенкой, гидролизует казеин сначала до олигопептидов, которые поглощаются клеткой с участием специфического пептидного транспорта и в дальнейшем под действием различных внутриклеточных пептидаз гидролизуются на короткоцепочечные пептиды и аминокислоты [45]. В настоящее время разработана модель микробной деградации казеина, транспорта и расщепления пептидов, а также регуляции стадий протеолиза [46].

Ферменты, продуцируемые различными видами молочнокислых бактерий, отличаются субстратной специфичностью и уровнем протеолитической активности [47]. Это учитывается при составлении композиций заквасочных культур с целью направленного регулирования процесса протеолиза при созревании сыров [48].

Молочнокислые бактерии вымирают в сыре во время его созревания, но их внутриклеточные ферменты, особенно пептидазы, высвобождаются и на протяжении всего срока созревания гидролизуют белки. На их долю приходится большая часть образующегося водорастворимого азота [49]. По природе продуцирования низкомолекулярных полипептидов они намного превосходят монокосвертывающие ферментные препараты [48]. Протеазы мезофильных заквасочных бактерий в основном активны в отношении пептидов, уже присутствующих в сыре в больших количествах в результате начального протеолиза, вызванного сычужным ферментом [32]. В мягких сырах без созревания или созревающих непродолжительное время действие ферментов молочнокислых микроорганизмов затруднено, так как они не активны по отношению к интактным казеинам. По данным Franco и др. [50] в испанских сырах Ahumado de Áliva, изготавливаемых с использованием лиофилизированной молочнокислой мезофильной закваски (*Lactococcus lactis subsp. lactis* и *Lactococcus lactis subsp. cremoris*) и телячьего сычужного фермента, после созревания в течение 28 суток деградировали только 22%  $\alpha_s$ -казеина и 9%  $\beta$ -казеина. Незначительный прирост растворимого (в том числе небелкового) азота говорил о слабом протеолизе

и что в данном случае основным протеолитическим агентом был сычужный фермент.

Различный состав микрофлоры заквасок в сочетании с технологическими особенностями производства обуславливает индивидуальные различия сыров разных видов по органолептическим показателям. Продуктам ферментативного гидролиза белка отводится в этом важная роль. В сырах с высокой температурой второго нагревания практически вся протеолитическая активность исходит от ферментов термофильных молочнокислых палочек. Их экзопептидазная активность, связанная с ферментами, расположенными на стенках живых микроорганизмов, сравнительно невелика. Поэтому вызываемый ими протеолиз на начальной стадии созревания сыра невысок. Отмирание микроорганизмов сопровождается лизисом их клеток, из которых выделяются эндопептидазы, вызывающие интенсивный протеолиз. Среди продуктов распада белка в сырах с высокой температурой второго нагревания заметная доля приходится на аминокислоты [49].

Сыры с низкой температурой второго нагревания созревают главным образом под действием ферментов мезофильной лактококковой микрофлоры. Протеазная активность у лактококков выражена сильнее, чем пептидазная. Поэтому в результате протеолиза в сырах с низкой температурой второго нагревания преимущественно образуются пептиды с разной длиной цепи [49].

#### 4. Протеолиз, катализируемый молокосвертывающими ферментами

Ключевым моментом процесса изготовления сыра является превращение молока в гель, способный к синерезису. Это достигается путем добавления в выдержанное с закваской молоко сычужного фермента или других молокосвертывающих ферментов — заменителей сычужного фермента. Использование молокосвертывающих ферментов в технологии изготовления созревающих сыров обязательно. Это важный функционально-необходимый ингредиент, основной задачей которого является свертывание молока с образованием геля.

Традиционно в сыроделии используется телячий сычужный фермент. Он представляет собой смесь нескольких молекулярных и генетических разновидностей химозина и пепсина. Химозин доминирует в составе сычужного фермента теленка, а пепсин — в сычужном ферменте взрослого животного. Содержание пепсина в сычужном ферменте зависит от возраста животного на момент убоя [51].

На начальной стадии свертывания молока химозин проявляет специфическую протеолитическую активность в отношении пептидной связи  $\text{Phe}_{105} - \text{Met}_{106}$  в молекуле к-казеина. В результате разрыва этой пептидной связи в сывороточную фазу высвобождается гидрофильный гликомакропептид. Остальная N-концевая часть к-казеина, называемая пара-к-казеином, остается связанной с мицеллой. Постепенная потеря гликомакропептида сопровождается снижением  $\zeta$ -потенциала мицелл. Это приводит к их дестабилизации и агрегации до состояния геля [52,53]. Агрегирование мицелл происходит, когда около 97% к-казеина в мицелле гидролизовалось [54].

В отличие от химозина, который преимущественно гидролизует пептидную связь  $\text{Phe}_{105} - \text{Met}_{106}$ , пепсин гораздо менее специфичен и гидролизует пептидные связи с остатками Leu, Phe, Tyr и Val [55]. Он специфичен, главным образом, по отношению к пептидным связям ароматических и объемных алифатических аминокислотных остатков, а также к связям, включающим глутаминовую кислоту [56]. Есть сведения о гидролизе пепсином белков оболочек жи-

ровых глобул [57]. При этом основные белки оболочек гидролизировались с разной скоростью: бутирофилин оказался более устойчивым, чем ксантинооксидаза, PAS-6 или PAS-7.

Высокая скорость неспецифического протеолиза, вызванного пепсином, может стать причиной получения дряблого геля, а также привести к большим потерям белка и жира с сывороткой. Интенсивный протеолиз при созревании сыров способен стать причиной появления пороков вкуса (горечь) и консистенции (мажущаяся, излишне мягкая). Для того чтобы избежать этого и получить сыры высокого качества, важно использовать молоко с кислотностью не более 18 °Т и регулировать процесс нарастания кислотности в сыроизготовителе, не допуская снижения величины рН в сырной массе ниже 5,1. Это условие необходимо соблюдать, чтобы ограничить протеолитическую активность пепсина, которая резко возрастает при рН ниже 5,0 [58].

Широкую протеолитическую активность проявляют также заменители сычужного фермента — микробные и растительные. Они расщепляют большее число связей, чем телячий химозин, не ограничиваясь к-казеином [59,60]. Критерием, определяющим пригодность заменителя сычужного фермента для свертывания молока в сыроделии, является величина отношения его молокосвертывающей активности к общей протеолитической активности. Для производства сыра пригодны только те ферменты, которые характеризуются высокими значениями этого соотношения [52,61]. Под молокосвертывающей активностью понимается специфическая протеолитическая активность в отношении связи  $\text{Phe}_{105} - \text{Met}_{106}$  в к-казеине. Химозин, составляющий основу телячьего сычужного фермента, служит для этого эталоном, так как обладает высокой молокосвертывающей активностью и низкой общей протеолитической активностью.

По сравнению с химозином, молокосвертывающие ферменты микробного происхождения характеризуются неспецифическим гидролизом и к-казеина, и пара-к-казеина [52,59]. Отношение их молокосвертывающей активности к общей протеолитической активности в среднем в 4 раза ниже, чем у молокосвертывающих ферментов животного происхождения, к которым относится телячий сычужный фермент [61].

Применение некоторых растительных ферментов, например, актинидина (получают из плодов киви), позволяет получать сыры с органолептическими показателями, подобными тем, что производятся с использованием сычужного фермента. Другие растительные ферменты, такие как протеазы имбиря или кукумизин (выделяют из мякоти мускусной дыни), обладают чрезмерной протеолитической активностью и способствуют развитию очень разных текстур и вкусов сыров с риском образования горьких пептидов. Для таких молокосвертывающих ферментов с высоким неспецифическим действием было разработано несколько усовершенствованных стратегий производства сыров. Так, например, эффективным способом улучшения текстуры и снижения горечи может быть применение растительного фермента в смеси с химозином. Положительно влияет увеличение продолжительности посолки сыра при созревании, а также использование молока, подвергнутого ультрафильтрации или концентрированию. Применение последних приемов обосновывается тем, что увеличение концентрации белков снижает риск слишком высокого общего протеолиза и образования горьких пептидов [60].

Неспецифическая протеолитическая активность заменителей сычужного фермента приводит к тому, что уже в процессе обработки зерна образуются водорастворимые пептиды, необратимо переходящие в сыворотку. Это влечет за собой снижение выхода сыра [59]. В этом случае сыворотку

рекомендуется использовать для производства сывороточных сыров [60].

Использование в сыроделии растительных ферментов не имеет широкого распространения. Основные причины: низкое соотношение молокосвертывающей и протеолитической активности, низкий выход сыра, дорогостоящая процедура экстракции ферментов из растительного сырья [30,61].

Действие молокосвертывающего фермента не заканчивается образованием молочного геля. Большая часть вносимого в молоко сычужного фермента теряется вместе с сыворожкой, но некоторое его количество сохраняется в геле. В зависимости от вида, количество молокосвертывающего фермента, переходящего в сыр, различно. Это связано с разной термоустойчивостью, степенью связи с молекулами казеина, а также с технологическими параметрами процесса изготовления сыра (рН, температура второго нагревания, содержание влаги в сырном зерне в конце обработки) [59].

Переходя в сыр, сычужный фермент играет главную роль на начальной стадии протеолиза казеинов при созревании сыра [62]. Химозин сначала расщепляет  $\alpha_{s1}$ -казеин по связи Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub>. Следующими расщепляемыми связями являются Leu<sub>101</sub>-Lys<sub>102</sub> и Trp<sub>164</sub>-Tyr<sub>165</sub>. Эти связи расщепляются химозином с гораздо меньшей скоростью по сравнению с первичным расщеплением связи Phe<sub>23</sub>-Phe<sub>24</sub>. Скорость гидролиза разных пептидных связей зависит от ионной силы и значения рН. Считается, что  $\alpha_{s2}$ -казеин и пара- $\kappa$ -казеин устойчивы к протеолизу под действием химозина. Их гидролиз в сыре носит ограниченный характер. В  $\beta$ -казеине химозин быстрее всего расщепляет пептидную связь Leu<sub>192</sub>-Tyr<sub>193</sub> и несколько медленнее — связи Ala<sub>189</sub>-Phe<sub>190</sub>, Leu<sub>165</sub>-Ser<sub>166</sub>, Gln<sub>167</sub>-Ser<sub>168</sub>, Leu<sub>139</sub>-Leu<sub>140</sub> и Leu<sub>127</sub>-Trp<sub>128</sub> [30].

Высококачественный (очищенный) телячий сычужный фермент содержит около 10% коровьего пепсина, но во многих промышленно выпускаемых ферментных препаратах содержится до 80% пепсина. Говяжий пепсин осуществляет гидролиз казеина главным образом в тех же областях, что и химозин. Но его действие гораздо менее специфично, поэтому высвобождается больше разных пептидов. Он участвует в гидролизе большего числа специфических пептидных связей  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - и  $\beta$ -казеинов, чем химозин [30].

Сычужный фермент особенно активен в сырах, приготовленных с использованием мезофильной закваски. Сыры, изготовленные из термофильных заквасок, обычно готовят при более высоких температурах, которые инактивируют протеолитическую активность сычужного фермента в сыре [32].

Во время созревания происходит множество биохимических и физико-химических изменений, при которых

белки распадаются на более мелкие фрагменты: пептиды, аминокислоты, амины, кислоты, тиолы, тиоэферы. В правильных сочетаниях с продуктами липолиза и гликолиза эти соединения играют важную роль в формировании характерных органолептических показателей различных сыров [63].

### Заключение

В основе производства большинства сыров лежат протеолитические процессы, непрерывно протекающие с разной степенью интенсивности на протяжении всего цикла изготовления сыра. Катализаторами ферментативного протеолиза на разных стадиях производства сыра являются нативные ферменты молока; экзо- и эндопептидазы заквасочных и незаквасочных микроорганизмов; молокосвертывающие ферменты.

Начальная стадия протеолиза происходит в молоке под действием нативных ферментов молока, в первую очередь, плазмина, который действует преимущественно на  $\beta$ - и  $\alpha_{s2}$ -казеины. При хранении молока перед производством сыра при низких температурах в нем развиваются психротрофные микроорганизмы, продуцирующие протеолитические ферменты. Термостабильные пептидазы психротрофов атакуют все формы казеина с преимущественным гидролизом  $\kappa$ -казеина, затем  $\beta$ -казеина и, наконец,  $\alpha$ -казеина. Ферменты молочнокислых микроорганизмов заквасок в зависимости от вида различаются субстратной специфичностью и уровнем протеолитической активности, гидролизуя практически все фракции казеина. Вклад в общий протеолиз вносится и молокосвертывающими ферментами, часть которых сохраняется в структуре сыра. В процессе свертывания молока основной компонент сычужного фермента — химозин — проявляет специфичность по отношению пептидной связи Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> в  $\kappa$ -казеине. А на начальной стадии протеолиза при созревании сыра он расщепляет пептидные связи  $\alpha_{s1}$ -казеина. Сопутствующий химозину пепсин менее специфичен и гидролизует большее число пептидных связей  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ - и  $\beta$ -казеинов.

Таким образом, все фракции казеина претерпевают необратимые изменения, непрерывно подвергаясь протеолизу на всех стадиях изготовления сыра. Особо важное значение протеолиз имеет на стадии созревания, когда проявляется совокупное действие всех протеолитических агентов, присутствующих в сыре. Разнообразные продукты протеолиза (пептиды, аминокислоты, ароматические соединения) при правильном сочетании с продуктами липолиза и гликолиза формируют характерный вкус различных сыров.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Thompson, A., Boland, M., Singh, H. (2009). Milk proteins: from expression to food. Academic Press, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.X0001-3>
- D'Ambrosio, C., Arena, S., Salzano, A. M., Renzone, G., Ledda, L., Scaloni, A. (2008). A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. *Proteomics*, 8(17), 3657–3666. <https://doi.org/10.1002/pmic.200701148>
- Rout, P.K., Verma, M. (2021). Post translational modifications of milk proteins in geographically diverse goat breeds. *Scientific Reports*, 11, Article 5619. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85094-9>
- Baptista, D.P., Gigante, M.L. (2021). Bioactive peptides in ripened cheeses: release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), 4010–4017. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11143>
- Goulding, D.A., Fox, P.F., O'Mahony, J.A. (2020). Milk proteins: An overview. Chapter in a book: Milk Proteins: From Expression to Food. Amsterdam: Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815251-5.00002-5>
- Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A. (2015). Milk proteins. Chapter in a book: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer International Publishing Switzerland, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
- Горбатова, К.К., Гунькова, П.И. (2010). Биохимия молока и молочных продуктов. СПб.: ГИОРД, 2010.
- Holland, J.W. (2008). Post-translational modifications of caseins. Chapter in a book: Milk Proteins: From Expression to Food. Amsterdam: Elsevier, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00004-0>
- O'Mahony, J. A., Fox, P. F. (2012). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. Chapter in a book: Advanced Dairy Chemistry. Springer, Boston, 2012. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_2)
- Guerin, J., Burgain, J., Gomand, F., Scher, J., Gaiani, C. (2017). Milk fat globule membrane glycoproteins: Valuable ingredients for lactic acid bacteria encapsulation? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 639–651. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1386158>
- Lopez, C., Cauty, C., Guyomarç'h, F. (2018). Unravelling the complexity of milk fat globules to tailor bioinspired emulsions providing health benefits: the key role played by the biological membrane. *European Journal*

- of *Lipid Science and Technology*, 121(10), Article 1800201. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800201>
12. Ельчанинов, В.В. (2019). Белки мембраны молочной жировой глобулы. 1. Генез и структура жировой глобулы молока, номенклатура белков мембраны. *Молочная промышленность*, 7, 24–27.
  13. Rogers, L.D., Overall, C.M. (2013). Proteolytic post-translational modification of P-proteins: Proteomic tools and methodology. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(12), 3532–3542. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031310>
  14. Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4–7), 327–345. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00062-0)
  15. Ward, O.P. (2011). 3.49 — Proteases. *Comprehensive Biotechnology*, 571–582. PMID: PMC7152071. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00222-1>
  16. Ardö, Y. (2021). Enzymes in cheese ripening. Chapter in a book: Agents of Change. Enzymes in Milk and Dairy Products. Switzerland: Springer, Cham., 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_15)
  17. Webb, E.C. (1992). Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. San Diego: Academic Press, 1992.
  18. France, T.C., O'Mahony, J.A., Kelly, A.L. (2021). The plasmin system in milk and dairy products. Chapter in a book: Agents of Change. Food Engineering Series. Springer, Cham., 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-5548-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-5548-8_2)
  19. Nielsen, S.S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6628–6634. <https://doi.org/10.1021/jf0201881>
  20. Crudden, A., Kelly, A.L. (2003). Studies of plasmin activity in whey. *International Dairy Journal*, 13(12), 987–993. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(03\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(03)00140-7)
  21. Srinivasan, M., Lucey, J.A. (2002). Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science*, 85(5), 1070–1078. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(02\)74167-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(02)74167-2)
  22. Borda, D., Indrawati, Smout, C., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2004). High pressure thermal inactivation kinetics of a plasmin system. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2351–2358. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73357-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73357-3)
  23. Budkevich, R.O., Eremina, A.I., Evdokimov, I.A., Fedortsov, N.M., Martak, A.A., Budkevich, E.V. (2018). The physical properties of the casein in solution: effect of ultra-high pressure. *Food Systems*, 1(3), 4–12. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2018-1-3-4-12>
  24. Villalobos, J.C., Sigler, A.I.G., Oliete, B., Sánchez, R.A., Jiménez, L., Sánchez, N.N. et al. (2015). Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe's milk. *Mljekarstvo*, 65(2), 138–143. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0208>
  25. Villalobos, J.C., Garzón, A.I., Martínez Marín, A.L., Arias, R., Ciocia, F., McSweeney, P.L.H. (2018). Plasmin activity in Manchega ewe milk: The effect of lactation, parity and health of the udder, and its influence on milk composition and rennet coagulation. *Small Ruminant Research*, 158, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.10.005>
  26. Sánchez, A.F., Muñoz, J.P., Villalobos, J.C., Sánchez, R.A., Garzón, A., de Pedro, E.A.S. (2021). Coagulation process in Manchega sheep milk from Spain: A path analysis approach. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 7544–7554. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19187>
  27. Somers, J.M., Guinee, T.P., Kelly, A.L. (2002). The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of mozzarella-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 55(1), 5–11. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00050.x>
  28. Мироненко, И.М. (2021). Функции ионного кальция и нативных протеаз молока в процессе сычужного свертывания. *Сырделие и маслоделие*, 1, 25–28. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2021-25-28>
  29. Мироненко, И.М. (2019). Вероятные участники процесса сычужного свертывания молока. *Сырделие и маслоделие*, 4, 20–23.
  30. Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F. (2017). Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis. Chapter in a book: Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018\\_1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018_1)
  31. Ozer, B.B., Akdemir-Evrendilek, G. (2014). Microbiology of Raw Milk. Chapter in a book: Dairy Microbiology and Biochemistry. Boca-Raton: CRC Press, 2017.
  32. Glück, C., Stuessler, T., Fischer, L. (2021). Heat-stable microbial peptidases associated with the microbiota of raw milk. Chapter in a book: Agents of Change. Enzymes in Milk and Dairy Products. Switzerland: Springer, Cham., 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_11)
  33. Pukančíková, L., Lipničanová, S., Kačániová, M., Chmelová, D., Ondrejovič, M. (2016). Natural microflora of raw cow milk and their enzymatic spoilage potential. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(2), 142–155. <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0015>
  34. Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S. et al. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.005>
  35. Datta, N., Deeth, H.C. (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT — Food Science and Technology*, 36(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00214-1)
  36. Kelly, A.L., Larsen, L.B. (2021). Agents of change: Enzymes in milk and dairy products. Springer Cham, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8>
  37. Settanni, L., Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
  38. Pogačić, T., Mancini, A., Santarelli, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E. et al. (2015). Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiology*, 36(2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.009>
  39. Wouters, J. T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 91–109. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00151-0)
  40. Bluma, A., Ciprova, I. (2015). Diversity of lactic acid bacteria in raw milk. *Research for Rural Development*, 1, 157–161.
  41. Hernandez-Valdes, J.A.; van Gestel, J.; Kuipers, O.P. (2020). A ribo-switch gives rise to multi-generational phenotypic heterogeneity in an auxotrophic bacterium. *Nature Communications*, 11(1), e00133. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15017-1>
  42. Tagliazucchi, D., Martini, S., Solieri, S. (2019). Bioprospecting for bioactive peptide production by lactic acid bacteria isolated from fermented dairy food. *Fermentation*, 5(96), Article 96. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040096>
  43. Parente, E., Cogan, T.M., Powell, I.B. (2017). Starter cultures: General aspects. Chapter in a book: Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Academic Press, 2017. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008\\_1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008_1)
  44. Китаевская, С.В., Пономарев, В.Я., Решетник, О.А. (2022). Оценка протеолитической активности новых штаммов лактобацилл с криорезистентными свойствами. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 12(1), 76–86. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-76-86>
  45. Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., Kot, A.M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7), Article 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
  46. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2003). Food — derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308. <https://doi.org/10.2174/1381612033454892>
  47. Головач, Т.Н., Жабанос, Н.К., Фурик, Н.Н., Курченко, В.П., Ризевский, С.В. (2013). Субстратная специфичность и уровень ферментной активности при расщеплении белковых фракций молока пробиотическими микроорганизмами. *Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья*, 8, 130–142.
  48. Одегов, Н. И. Гришкова, А.В., Белов, А.Н. (2019). К вопросу направленного регулирования протеолитических процессов в сырах. *Сырделие и маслоделие*, 5, 24–26. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2019-5-24-26>
  49. Мягконос, Д.С., Мордвинова, В.А., Абрамов, Д.В., Делицкая, И.Н. (2014). Особенности протеолиза у сыров различных видовых групп. *Сырделие и маслоделие*, 2, 24–27.
  50. Franco, I., Prieto, B., Urdiales, R., Fresno, J.M., Carballo, J. (2001). Study of the biochemical changes during ripening of Ahumado de Aliva cheese: a Spanish traditional variety. *Food Chemistry*, 74(4), 463–469. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(01\)00164-9](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(01)00164-9)
  51. Rampilli, M., Larsen, R., Harboe, M. (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International Dairy Journal*, 15(11), 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.10.003>
  52. Horne, D.S., Lucey, J.A. (2017). Rennet-induced coagulation of milk. Chapter in a book: Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417012-4.00005-3>
  53. Britten, M., Giroux, H.J. (2021). Rennet coagulation of heated milk: A review. *International Dairy Journal*, 124, Article 105179. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105179>
  54. Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2016). Enzymatic coagulation of milk. Chapter in a book: Fundamentals of Cheese Science, New York: Springer, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7)
  55. Jaros, D., Rohm, H. (2017). Rennets: Applied aspects. Chapter in a book: Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Academic Press, 2017. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00003\\_1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00003_1)
  56. Кригер, А.В., Белов, А.Н. (2010). Влияние ферментных композиций на протеолиз в сырах. *Сырделие и маслоделие*, 3, 38–40.
  57. Ye, A., Cui, J., Singh, H. (2011). Proteolysis of milk fat globule membrane proteins during in vitro gastric digestion of milk. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2762–2770. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4099>
  58. Абрамов, Д.В., Мягконос, Д.С., Делицкая, И.Н., Мордвинова, В.А., Муничева, Т.Э., Овчинникова, Е.Г. (2019). Перспективы применения комплексных МФП для производства созревающих сычужных сыров. *Сырделие и маслоделие*, 1, 24–26. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2019-1-24-26>
  59. Мягконос, Д.С., Абрамов, Д.В., Овчинникова, Е.Г., Муничева, Т.Э. (2019). Перспективы использования микробных заменителей химозина в сырделии. *Сырделие и маслоделие*, 4, 14–17.



60. Amira, A. B., Besbes, S., Attia, H., Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S76–S93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>
61. 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>
62. Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 343–360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
63. Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379–1400. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8)

## REFERENCES

1. Thompson, A., Boland, M., Singh, H. (2009). Milk proteins: from expression to food. Academic Press, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.X0001-3>
2. D'Ambrosio, C., Arena, S., Salzano, A. M., Renzone, G., Ledda, L., Scaloni, A. (2008). A proteomic characterization of water buffalo milk fractions describing PTM of major species and the identification of minor components involved in nutrient delivery and defense against pathogens. *Proteomics*, 8(17), 3657–3666. <https://doi.org/10.1002/pmic.200701148>
3. Rout, P.K., Verma, M. (2021). Post translational modifications of milk proteins in geographically diverse goat breeds. *Scientific Reports*, 11, Article 5619. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85094-9>
4. Baptista, D.P., Gigante, M.L. (2021). Bioactive peptides in ripened cheeses: release during technological processes and resistance to the gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(10), 4010–4017. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11143>
5. Goulding, D.A., Fox, P.F., O'Mahony, J.A. (2020). Milk proteins: An overview. Chapter in a book: Milk Proteins: From Expression to Food. Amsterdam: Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815251-5.00002-5>
6. Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A. (2015). Milk proteins. Chapter in a book: Dairy Chemistry and Biochemistry. Springer International Publishing Switzerland, 2015. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-14892-2>
7. Gorbatova, K.K., Gunkova, P.I. (2010). Biochemistry of milk and dairy products. Saint-Petersburg: GIOR, 2010. (In Russian)
8. Holland, J.W. (2008). Post-translational modifications of caseins. Chapter in a book: Milk Proteins: From Expression to Food. Amsterdam: Elsevier, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374039-7.00004-0>
9. O'Mahony, J. A., Fox, P. F. (2012). Milk Proteins: Introduction and Historical Aspects. Chapter in a book: Advanced Dairy Chemistry. Springer, Boston, 2012. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4714-6_2)
10. Guerin, J., Burgain, J., Gomand, F., Scher, J., Gaiani, C. (2017). Milk fat globule membrane glycoproteins: Valuable ingredients for lactic acid bacteria encapsulation? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(4), 639–651. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1386158>
11. Lopez, C., Cauty, C., Guyomarç'h, F. (2018). Unravelling the complexity of milk fat globules to tailor bioinspired emulsions providing health benefits: the key role played by the biological membrane. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(10), Article 1800201. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800201>
12. Elchaninov, V.V. (2019). The proteins of milk fat globule membrane. 1. Genesis and structure of the milk fat globule, nomenclature of proteins of milk fat globule membrane. *Dairy Industry*, 7, 24–27. (In Russian)
13. Rogers, L. D., Overall, C. M. (2013). Proteolytic post-translational modification of P<sub>1</sub>proteins: Proteomic tools and methodology. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(12), 3532–3542. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.031310>
14. Sousa, M.J., Ardö, Y., McSweeney, P.L.H. (2001). Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 11(4-7), 327–345. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00062-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00062-0)
15. Ward, O.P. (2011). 3.49 – Proteases. *Comprehensive Biotechnology*, 571–582. PMID: PMC7152071. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00222-1>
16. Ardö, Y. (2021). Enzymes in cheese ripening. Chapter in a book: Agents of Change. Enzymes in Milk and Dairy Products. Switzerland: Springer, Cham., 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_15)
17. Webb, E.C. (1992). Enzyme nomenclature 1992. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes. San Diego: Academic Press, 1992.
18. France, T.C., O'Mahony, J.A., Kelly, A.L. (2021). The plasmin system in milk and dairy products. Chapter in a book: Agents of Change. Food Engineering Series. Springer, Cham., 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-5548-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-5548-8_2)
19. Nielsen, S.S. (2002). Plasmin system and microbial proteases in milk: Characteristics, roles, and relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6628–6634. <https://doi.org/10.1021/jf0201881>
20. Crudden, A., Kelly, A.L. (2003). Studies of plasmin activity in whey. *International Dairy Journal*, 13(12), 987–993. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(03\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(03)00140-7)
21. Srinivasan, M., Lucey, J.A. (2002). Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science*, 85(5), 1070–1078. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74167-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74167-2)
22. Borda, D., Indrawati, Smout, C., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2004). High pressure thermal inactivation kinetics of a plasmin system. *Journal of Dairy Science*, 87(8), 2351–2358. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73357-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73357-3)
23. Budkevich, R.O., Eremina, A.I., Evdokimov, I.A., Fedortsov, N.M., Martak, A.A., Budkevich, E.V. (2018). The physical properties of the casein in solution: effect of ultra-high pressure. *Food Systems*, 1(3), 4–12. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2018-1-3-4-12>
24. Villalobos, J.C., Sigler, A.I.G., Oliete, B., Sánchez, R.A., Jiménez, L., Sánchez, N.N. et al. (2015). Relationship of somatic cell count and composition and coagulation properties of ewe's milk. *Mljekarstvo*, 65(2), 138–143. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2015.0208>
25. Villalobos, J.C., Garzón, A.I., Martínez Marín, A.L., Arias, R., Ciocia, F., McSweeney, P.L.H. (2018). Plasmin activity in Manchega ewe milk: The effect of lactation, parity and health of the udder, and its influence on milk composition and rennet coagulation. *Small Ruminant Research*, 158, 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.10.005>
26. Sánchez, A.F., Muñoz, J.P., Villalobos, J.C., Sánchez, R.A., Garzón, A., de Pedro, E.A.S. (2021). Coagulation process in Manchega sheep milk from Spain: A path analysis approach. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 7544–7554. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19187>
27. Somers, J.M., Guinee, T. P., Kelly, A.L. (2002). The effect of plasmin activity and cold storage of cheese milk on the composition, ripening and functionality of mozzarella-type cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 55(1), 5–11. <https://doi.org/10.1046/j.1471-0307.2002.00030.x>
28. Mironenko, I.M. (2021). Functions of ionic calcium and native milk proteases in the process of rennet clotting. *Cheesemaking and Buttermaking*, 1, 25–28. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2021-25-28> (In Russian)
29. Mironenko, I.M. (2019). Probable participants in the process of rennet coagulation of milk. *Cheesemaking and Buttermaking*, 4, 20–23. (In Russian)
30. Ardö, Y., McSweeney, P.L.H., Magboul, A.A., Upadhyay, V.K., Fox, P.F. (2017). Biochemistry of cheese ripening: Proteolysis. Chapter in a book: Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018\\_1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00018_1)
31. Ozer, B.B., Akdemir-Evrendilek, G. (2014). Microbiology of Raw Milk. Chapter in a book: Dairy Microbiology and Biochemistry. Boca-Raton: CRC Press, 2017.
32. Glück, C., Stressler, T., Fischer, L. (2021). Heat-stable microbial peptidases associated with the microbiota of raw milk. Chapter in a book: Agents of Change. Enzymes in Milk and Dairy Products. Switzerland: Springer, Cham., 2021. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8\\_11](https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8_11)
33. Pukančíková, L., Lipničánová, S., Kačániová, M., Chmelová, D., Ondrejovič, M. (2016). Natural microflora of raw cow milk and their enzymatic spoilage potential. *Nova Biotechnologica et Chimica*, 15(2), 142–155. <https://doi.org/10.1515/nbec-2016-0015>
34. Baur, C., Krewinkel, M., Kranz, B., von Neubeck, M., Wenning, M., Scherer, S. et al. (2015). Quantification of the proteolytic and lipolytic activity of microorganisms isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 49, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2015.04.005>
35. Datta, N., Deeth, H.C. (2003). Diagnosing the cause of proteolysis in UHT milk. *LWT – Food Science and Technology*, 36(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00214-1)
36. Kelly, A.L., Larsen, L.B. (2021). Agents of change: Enzymes in milk and dairy products. Springer Cham, 2021. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-55482-8>
37. Settanni, L., Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.023>
38. Pogačić, T., Mancini, A., Santarelli, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E. et al. (2013). Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiology*, 36(2), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.009>
39. Wouters, J. T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G. (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 91–109. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00151-0)
40. Bluma, A., Ciprovica, I. (2015). Diversity of lactic acid bacteria in raw milk. *Research for Rural Development*, 1, 157–161.
41. Hernandez-Valdes, J.A.; van Gestel, J.; Kuipers, O.P. (2020). A ribo-switch gives rise to multi-generational phenotypic heterogeneity in an auxotrophic bacterium. *Nature Communications*, 11(1), e00133. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15017-1>
42. Tagliacuzzi, D., Martini, S., Solieri, L. (2019). Bioprospecting for bioactive peptide production by lactic acid bacteria isolated from fermented

- dairy food. *Fermentation*, 5(96), Article 96.. <https://doi.org/10.3390/fermentation5040096>
43. Parente, E., Cogan, T.M., Powell, I.B. (2017). Starter cultures: General aspects. Chapter in a book: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, 2017. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008\\_1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00008_1)
  44. Kitaevskaya, S.V., Ponomarev, V.Y., Reshetnik, O.A. (2022). Evaluation of the proteolytic activity of new cryoresistant lactobacillus strains. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*, 12(1), 76–86. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-1-76-86> (In Russian)
  45. Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., Kot, A.M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules*, 26(7), Article 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
  46. Korhonen, H., Pihlanto, A. (2005). Food – derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1297–1308. <https://doi.org/10.2174/1381612033454892>
  47. Halavach, T.N., Zhabanos, N.K., Furik, N.N., Kurchenko, V.P., Rizevsky, S.V. (2013). Substrate specificity and enzymatic activity level in the cleavage of milk protein fractions with probiotic microorganisms. *Topical Issues of Processing of Meat and Milk Raw Materials*, 8, 130–142. (In Russian)
  48. Odegov, N.I., Grishkova, A.V., Belov, A.N. (2019). To the question of directed regulation of proteolytic processes in cheeses. *Cheesemaking and Buttermaking*, 5, 24–26. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2019-5-24-26> (In Russian)
  49. Myagkonosov, D.S., Mordvinova, V.A., Abramov, D.V., Delitskaya, I.N. (2014). Special features of proteolysis in different groups of cheese types. *Cheesemaking and Buttermaking*, 2, 24–27. (In Russian)
  50. Franco, I., Prieto, B., Urdiales, R., Fresno, J.M., Carballo, J. (2001). Study of the biochemical changes during ripening of Ahumado de *Aliva* cheese: a Spanish traditional variety. *Food Chemistry*, 74(4), 463–469. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00164-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00164-9)
  51. Rampilli, M., Larsen, R., Harboe, M. (2005). Natural heterogeneity of chymosin and pepsin in extracts of bovine stomachs. *International Dairy Journal*, 15(11), 1130–1137. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.10.003>
  52. Horne, D.S., Lucey, J.A. (2017). Rennet-induced coagulation of milk. Chapter in a book: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00005-3>
  53. Britten, M., Giroux, H.J. (2021). Rennet coagulation of heated milk: A review. *International Dairy Journal*, 124, Article 105179. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105179>
  54. Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2016). Enzymatic coagulation of milk. Chapter in a book: *Fundamentals of Cheese Science*, New York: Springer, 2016. [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7681-9_7)
  55. Jaros, D., Rohm, H. (2017). Rennets: Applied aspects. Chapter in a book: *Cheese. Chemistry, Physics and Microbiology*. Academic Press, 2017. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00003\\_1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00003_1)
  56. Kriger, A.V., Belov, A.N. (2010). Effect of enzyme compositions on cheese proteolysis. *Cheesemaking and Buttermaking*, 3, 38–40. (In Russian)
  57. Ye, A., Cui, J., Singh, H. (2011). Proteolysis of milk fat globule membrane proteins during in vitro gastric digestion of milk. *Journal of Dairy Science*, 94(6), 2762–2770. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-4099>
  58. Abramov, D.V., Myagkonosov, D.S., Delitskaya, I.N., Mordvinova, V.A., Munchieva, T.E., Ovchinnikova, E. G. (2019). Perspectives of using complex milk-clotting enzyme preparations for ripening rennet cheeses production. *Cheesemaking and Buttermaking*, 1, 24–26. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2019-1-24-26> (In Russian)
  59. Myagkonosov, D.S., Abramov, D.V., Ovchinnikova, E.G., Munchieva, T.E. (2019). Prospects of using microbial substitutes of chymosin in cheesemaking. *Cheesemaking and Buttermaking*, 4, 14–17. (In Russian)
  60. Amira, A. B., Besbes, S., Attia, H., Blecker, C. (2017). Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup1), S76–S93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>
  61. 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> (In Russian)
  62. Khattab, A. R., Guirguis, H. A., Tawfik, S. M., Farag, M. A. (2019). Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment. *Trends in Food Science and Technology*, 88, 343–360. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>
  63. Fox, P.F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science*, 72(6), 1379–1400. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79246-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79246-8)

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ	AUTHOR INFORMATION
<b>Принадлежность к организации</b>	<b>Affiliation</b>
<p><b>Лепилкина Ольга Валентиновна</b> — доктор технических наук, главный научный сотрудник, отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19 Tel.: +7-910-965-51-61, E-mail: ov.lepilkina@fncps.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-2375-3959">https://orcid.org/0000-0002-2375-3959</a> * автор для контактов</p>	<p><b>Olga. V. Lepilkina</b>, Doctor of Technical Sciences, Leading Scientific Worker, Department of Physical Chemistry, All-Russian Scientific Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-910-965-51-61 E-mail: ov.lepilkina@fncps.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0002-2375-3959">https://orcid.org/0000-0002-2375-3959</a> * corresponding author</p>
<p><b>Григорьева Анастасия Игоревна</b> — младший научный сотрудник, отдел физической химии, Всероссийский научно-исследовательский институт маслоделия и сыроделия 152613, Ярославская обл., Углич, Красноармейский бульвар, 19 Tel.: +7-901-051-62-46 E-mail: a.grigoriyeva@fncps.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-4364-0342">https://orcid.org/0000-0003-4364-0342</a></p>	<p><b>Anastasija I. Grigorieva</b>, Junior Researcher, Department of Physical Chemistry, All-Russian Research Institute of Butter- and Cheesemaking 19, Krasnoarmeysky Boulevard, Uglich, 152613, Yaroslavl Region, Russia Tel.: +7-901-051-62-46 E-mail: a.grigoriyeva@fncps.ru ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-4364-0342">https://orcid.org/0000-0003-4364-0342</a></p>
<b>Критерии авторства</b>	<b>Contribution</b>
<p>Авторы в равных долях имеют отношение к написанию рукописи и одинаково несут ответственность за плагиат.</p>	<p>Authors equally relevant to the writing of the manuscript, and equally responsible for plagiarism.</p>
<b>Конфликт интересов</b>	<b>Conflict of interest</b>
<p>Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.</p>	<p>The authors declare no conflict of interest.</p>