

Определение молокосвертывающей активности ферментных препаратов с помощью микропланшетного турбидиметрического метода*

Игорь Михайлович Бердышев, младший научный сотрудник

E-mail: igorqetu@mail.ru

Илья Валерьевич Демидюк, д-р хим. наук, профессор РАН, доцент, заместитель

руководителя Курчатковского комплекса НБИКС-природоподобных технологий по научной работе

E-mail: ilyaduk@yandex.ru

Национальный исследовательский центр «Курчатowski институт», г. Москва

Молокосвертывающая активность является ключевым показателем качества ферментов, используемых в сыроделии. Традиционный метод определения молокосвертывающей активности (REMCAT), основанный на визуальной фиксации момента свертывания, субъективен и неэффективен при анализе большого числа образцов. В качестве альтернативы могут быть использованы микропланшетные турбидиметрические методы, позволяющие объективно и с высокой производительностью измерять молокосвертывающую активность. Нами был проведен анализ критических параметров (рН, состав буфера, температура, концентрация ионов кальция, концентрация субстрата, длина волны измерения), определяющих протекание реакции, на основе этого анализа выбраны условия, обеспечивающие эффективное определение молокосвертывающей активности. Ключевым отличием предложенного метода является упрощенный способ определения времени свертывания по достижению фиксированного значения оптической плотности. Тестирование метода с использованием препарата рекомбинантного химозина CHY-MAX Extra продемонстрировало линейность зависимости активности от концентрации фермента ($R^2 > 0,98$) в диапазоне 500–5000 нг/мл. Калибровка метода с использованием стандартного образца молокосвертывающего фермента позволяет получать результаты измерения активности в общепринятых единицах. Разработанный метод дает возможность проводить количественную оценку общей молокосвертывающей активности при минимальном расходе фермента и субстрата. Предложенный протокол является эффективным инструментом для высокопроизводительного скрининга новых рекомбинантных и природных молокосвертывающих ферментов, обеспечивая высокую скорость анализа и простоту обработки данных.

Ключевые слова: химозин, молокосвертывающая активность, микропланшетный турбидиметрический метод, сыроделие

Для цитирования: Бердышев, И. М. Определение молокосвертывающей активности ферментных препаратов с помощью микропланшетного турбидиметрического метода / И. М. Бердышев,

И. В. Демидюк // Сыроделие и маслоделие. 2026. № 3. С. 36–43. <https://doi.org/10.21603/2073-4018-2026-3-67>

Введение

Определение активности используемых при производстве сыра молокосвертывающих ферментов является критически важным, поскольку их дозировка влияет на скорость коагуляции, качество и структуру сгустка, а также на выход готового сыра, его консистенцию и вкус. Для правильной оценки активности необходимо учитывать, что ферментативное свертывание молока представляет собой как минимум двухстадийный процесс [1]. На первой стадии происходит ферментативный гидролиз, в ходе которого фермент специфически расщепляет пептидную связь Phe105-Met106 или близлежащие связи в молекуле κ -казеина, расположенной на поверхности казеиновых мицелл. При гидролизе ~85 % молекул κ -казеина начинается вторая стадия – агрегация (флокуляция)

дестабилизированных казеиновых мицелл и образование геля (иногда выделяют в отдельную третью стадию), который со временем уплотняется и разделяется на сгусток и сыворотку. Общая молокосвертывающая активность (МСА) отражает суммарный результат обеих стадий [2].

Традиционным и общепринятым методом определения МСА является испытание на относительную МСА (RElative Milk-Clotting Activity Test, REMCAT). Этот тест основан на определении времени, необходимого для свертывания обезжиренного молочного субстрата исследуемым ферментом при определенных условиях (рН, температура, концентрация CaCl_2 и др.), и сравнении его со временем свертывания для контрольного фермента с известной МСА. Один из вариантов этого метода стандартизован Между-

*Работа проведена в рамках выполнения государственного задания НИЦ «Курчатowski институт».

народной молочной федерацией для определения активности говяжьего сычужного фермента (международный стандарт ISO 11815:2007 | IDF 157:2007, в России действует идентичный межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 11815-2015). Несмотря на широкое распространение на производстве, метод REMCAT обладает рядом существенных недостатков. Основным из них является субъективность визуального определения конечной точки (времени свертывания) по появлению первых признаков коагуляции (хлопьев) в тонкой пленке молока на стенках вращающейся пробирки [3]. Зависимость от субъективной оценки и квалификации оператора может приводить к невоспроизводимым результатам. Кроме того, метод REMCAT не позволяет тестировать большое количество образцов при различных условиях и отслеживать динамику процесса коагуляции, что ограничивает его применение в высокопроизводительном скрининге и исследовании кинетики ферментативного свертывания молока.

Помимо визуальной фиксации времени свертывания при определении МСА к настоящему времени разработан ряд альтернативных подходов, основанных на оценке времени свертывания по изменению различных физических параметров при формировании сгустка. В зависимости от физических принципов детекции и регистрируемых параметров эти подходы можно разделить на механические (измерение реологических характеристик, таких как вязкость, модули упругости и сдвига), вибрационные, ультразвуковые, термические, оптические (измерение оптических свойств, таких как пропускание или обратное рассеяние / диффузное отражение света) [4]. Все эти подходы могут быть использованы как для определения времени свертывания (начального момента коагуляции), так и для дальнейшего отслеживания упрочнения сгустка для определения времени резки сгустка (*curd cutting time*) при достижении определенной твердости. Однако эффективность различных подходов в фиксации каждой из этих стадий различается в зависимости от используемого принципа детекции. Большинство промышленных систем (например, CoAguLite, Optigraph, FormaGraph) ориентированы на мониторинг процесса сворачивания молока в режиме реального времени непосредственно в сыродельных ваннах. Такие системы эффективны для контроля технологического процесса и предсказания времени резки

сгустка, однако малоприспособлены для определения МСА молокосвертывающих ферментов в лаборатории из-за сложности оборудования, высокого расхода реагентов и необходимости применения математических моделей для анализа кинетических кривых.

Существуют методы определения активности молокосвертывающих ферментов, основанные исключительно на измерении скорости гидролиза κ -казеина и не учитывающие стадию агрегации. В таких методах в качестве субстратов используются либо молекулы κ -казеина, меченные флуорофорами [5, 6], либо имитирующие сайт расщепления κ -казеина синтетические пептиды с внутримолекулярным тушением флуоресценции¹ [7, 8]. Эти методы направлены на изучение кинетических параметров (K_m , k_{cat}) ферментативной реакции гидролиза субстрата и позволяют обнаруживать ферменты в очень низких концентрациях (от 1 нг/мл), которые не детектируются при использовании методов определения МСА. Такие методы хорошо подходят для поиска новых ферментов и характеристики их активности, но требуют использования уникальных и / или дорогостоящих субстратов.

Таким образом, разработка простых, быстрых и объективных способов оценки МСА остается актуальной в контексте поиска и изучения новых молокосвертывающих ферментов, например протеаз, из новых природных источников [9–11] и рекомбинантных химозин [12–16]. В подобных исследованиях требуется проводить массовую оценку МСА при различных условиях (pH, температура, концентрация ионов кальция), а также контролировать процесс в ходе разработки эффективных схем очистки ферментов. Для решения этих задач наиболее перспективными, на наш взгляд, являются методы, используемые для определения времени свертывания турбидиметрию [13, 17, 18]. В таких методах для регистрации изменений мутности молочного субстрата в процессе коагуляции используют планшетные фотометры. Они обеспечивают объективность измерения, высокую воспроизводимость и позволяют проводить высокопроизводительный скрининг при минимальном расходе ферментов и субстрата. Для определения МСА микропланшетные турбидиметрические методы, в отличие от промышленных систем мониторинга, значительно проще в аппаратном оформлении и анализе данных.

¹Патент № 2 825 311 РФ. Экспресс тест-система определения пепсиновой и химозиновой активности молокосвертывающих ферментов: № 2023125579; заявл. 05.10.2023; опубл. 23.08.2024 / А. Г. Кессених, И. В. Манухов, И. Г. Халиуллин; заявитель ООО Биофизтех. – 11 с.

В данной работе представлен микропланшетный турбидиметрический метод определения МСА, подходящий для высокопроизводительного скрининга и объективной оценки общей МСА ферментных препаратов. Предложенный метод является модификацией известных турбидиметрических подходов. В рамках исследования проведен анализ критических параметров (рН, состав буфера, температура, концентрация ионов кальция, концентрация субстрата, длина волны измерения), оказывающих существенное влияние на измерение МСА, и выбраны значения, обеспечивающие приемлемое время определения активности при малом расходе фермента. Кроме того, модифицирован способ определения времени коагуляции, в качестве критерия использовано время достижения фиксированного значения оптической плотности, что упрощает процедуру расчета МСА по сравнению с методами, основанными на вычислении производных.

Цель исследования заключалась в разработке и оптимизации микропланшетного турбидиметрического метода определения молоко-свертывающей активности, пригодного для высокопроизводительного скрининга и объективной оценки ферментных препаратов.

Объекты и методы исследования

В качестве субстрата использовали 4 % раствор сухого обезжиренного молока (COM) в 50 мМ натрий-ацетатном буфере рН 5,5 (NaAc) с содержанием 10 мМ CaCl_2 . Для приготовления субстрата к 600 мг COM (AppliChem, Германия) добавляли 14 мл NaAc и тщательно перемешивали до полного растворения. К полученному раствору добавляли 150 мкл 1М CaCl_2 и доводили объем буфером до 15 мл. Молочный субстрат готовили непосредственно перед анализом и не хранили, в процессе работы субстрат находился при комнатной температуре.

В работе был использован жидкий препарат рекомбинантного химозина CHY-MAX Extra (Chr. Hansen, Дания) с активностью 600 IMCU/мл (IMCU, International Milk Clotting Units – международные единицы молоко-свертывающей активности в соответствии со стандартом ISO 11815:2007 | IDF 157:2007, ГОСТ ISO 11815-2015). В качестве стандарта для калибровки использовали отраслевой контрольный образец сычужного фермента (ОКО СФ) с активностью 100000 ± 2500 УЕ/г (ВНИИ маслоделия и сыроделия – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН). (УЕ – условные единицы молоко-

свертывающей активности в соответствии с ГОСТ 34353-2017). Концентрацию белка в ферментном препарате определяли по методу Брэдфорд [19].

Для регистрации изменения оптической плотности использовали микропланшетный многофункциональный прибор CLARIOstar Plus (BMG, Германия), способный измерять оптическую плотность в кинетическом режиме с контролем температуры. Для определения МСА в лунки прозрачного 96-луночного планшета добавляли 20 мкл образца анализируемого фермента или 20 мкл NaAc (для контроля фонового сигнала молочного субстрата). Планшет с образцами инкубировали в приборе при 37 °С в течение 2 мин. Реакцию инициировали добавлением 180 мкл молочного субстрата, предварительно прогретого до 37 °С. После добавления субстрата планшет инкубировали в приборе при 37 °С в течение 15–30 мин, регистрируя оптическую плотность при 880 нм каждые 15 с. За одну единицу активности (ЕА) принимали такое количество фермента, для которого время свертывания составляет 5 мин в условиях реакции.

Анализ данных проводили при помощи программы GraphPad Prism версии 9.0 (GraphPad Software, США).

Результаты и их обсуждение

При разработке количественных методов анализа молоко-свертывающей активности (МСА) необходимо учитывать ряд параметров, оказывающих значительное влияние на специфичность, чувствительность, воспроизводимость измерения. На основе анализа литературных данных нами были выбраны условия реакции, обеспечивающие эффективное определение МСА. Предложенные параметры могут быть рекомендованы в качестве базовых для измерений МСА большинства молоко-свертывающих ферментов.

Для измерения МСА наиболее часто используют диапазон рН 5,5–6,0 [13, 20]. При этом большинство молоко-свертывающих ферментов, используемых в сыроделии, являются кислыми протеазами с оптимумом активности в области рН 3–5. Например, бычий химозин, наиболее распространенный в промышленности фермент, имеет оптимум молоко-свертывающей активности при рН 4,0 и температуре 37 °С [14]. При этом значение рН свежего коровьего молока около 6,6, что сильно отличается от рН оптимума химозина. Однако именно при

pH молока химозин проявляет уникально высокую специфичность к гидролизу *κ*-казеина. Высокий уровень МСА при низкой общей протеолитической активности является ключевым показателем качества фермента в сыроделии и критически важен для правильного созревания сыра без дефектов вкуса и текстуры. При разработке метода анализа МСА необходимо найти баланс между желанием повысить чувствительность метода, работая при значениях pH, близких к оптимуму фермента, и риском индуцировать кислотную коагуляцию молока, которая становится значимой при $\text{pH} < 6,0$ и резко усиливается при приближении к изоэлектрической точке казеина ($\text{pH} 4,6$). Для данного метода мы выбрали $\text{pH} 5,5$, что повышает активность фермента по сравнению с $\text{pH} 6,0$, но, как было проверено экспериментально, не вызывает кислотной коагуляции молока в течение всего времени анализа (до 30 мин).

С рабочим значением pH неразрывно связан выбор буферного раствора. Необходимо избегать присутствия в составе буфера фосфатов и цитратов, т. к. эти анионы связывают ионы кальция (Ca^{2+}), что приводит к ингибированию стадии агрегации. Обеспечить хорошую буферную емкость в диапазоне $\text{pH} 5,5\text{--}6,0$ способны буферы на основе 2-(*N*-морфолино)этансульфоновой кислоты или ацетата натрия [13, 20]. Использование данных буферов в диапазоне концентраций 25–50 мМ гарантирует стабильность pH реакционной смеси при добавлении фермента и не оказывает влияния на активность. Из экономических соображений в качестве рабочего буфера нами был выбран 50 мМ натрий-ацетатный буфер с $\text{pH} 5,5$.

Важным компонентом реакционной смеси являются ионы кальция, которые играют ключевую роль в агрегации дестабилизированных казеиновых мицелл. При недостатке Ca^{2+} агрегация замедляется или может не произойти совсем. Для стандартизации анализа и обеспечения воспроизводимости результатов измерения МСА в качестве субстрата обычно используется сухое обезжиренное молоко (СОМ). При производстве сухого молока применяется температурная обработка, при которой часть кальция переходит в нерастворимые соли, что замедляет процесс свертывания. Для восстановления способности субстрата к коагуляции к нему добавляют хлорид кальция. Оптимальная концентрация CaCl_2 , при которой МСА максимальна, зависит от конкретного фермента и требует экспе-

риментального определения [20, 21]. По литературным данным, максимальная активность рекомбинантных химозинов наблюдается в диапазоне 5–20 мМ CaCl_2 [14, 22]; в данном методе мы использовали среднее значение – 10 мМ CaCl_2 .

Концентрация СОМ в субстрате варьируется в зависимости от конкретного метода анализа. В международном стандарте ISO 11815:2007 | IDF 157:2007 используется 11 % (масса/объем) раствор СОМ. В других реализациях метода REMCAT применяются концентрации СОМ 12 % (традиционный метод Берриджа [12, 20]) и 26 % [15, 21]. При использовании турбидиметрических методов, при которых измеряется светопропускание, концентрацию СОМ значительно снижают для обеспечения прозрачности среды для прохождения света. Так, согласно ГОСТ 34353-2017, в автоматизированных фотометрических установках используются концентрации СОМ 0,1 % (при $\text{pH} 5,6$) и 0,65 % (при $\text{pH} 6,5$), а измерения проводятся при 450 нм. В микропланшетных тестах встречаются концентрации 1 %, при этом детекция ведется при 540 и 690 нм [17, 18]. Специализированные оптические системы (Optigraph, Gelograph) способны работать при высоких концентрациях субстрата (11 % и выше) за счет использования ближнего инфракрасного диапазона (800–900 нм, инфракрасное излучение обладает высокой проникающей способностью в мутных средах) и технических решений по автоматической регулировке интенсивности сигнала [2]. В методах, основанных на измерении обратного светорассеяния (диффузного отражения), также используются высокие концентрации СОМ и инфракрасный диапазон длин волн, например, системы CoAguLite / CoaguLab работают при 880 нм [23]. В данном методе выбрана концентрация СОМ 4 % в сочетании с длиной волны 880 нм, что обеспечивает начальное значение оптической плотности $\text{OD}_{880} \approx 1,7$ и позволяет удерживать сигнал в пределах рабочего диапазона детектора прибора (до 3 OD) на протяжении всей реакции. Описан аналогичный микропланшетный подход с использованием 4 % концентрации СОМ, однако в нем применялась длина волны 800 нм [13]. В данном методе длину волны 880 нм выбрали на основе анализа спектра поглощения молочного субстрата до и после коагуляции. При 880 нм наблюдалась максимальная амплитуда изменения оптического сигнала при коагуляции в сочетании с низким начальным сигналом.

Скорость ферментативной реакции и агрегации мицелл сильно зависит от температуры. В международном стандарте ISO 11815:2007 | IDF 157:2007 коагуляцию контрольного молочного субстрата проводят при температуре 32 °С, поскольку эта температура используется на этапе внесения молоко-свертывающего фермента при производстве многих видов сыров. Температуры 35 и 37 °С чаще встречаются в лабораторной практике при изучении рекомбинантных ферментов. Температура 35 °С являлась стандартной для традиционного метода определения МСА в единицах Сокслета (Soxhlet's units) [24]. Температуру 37 °С часто выбирают для увеличения скорости анализа и чувствительности метода, т. к. эта температура ближе к температурному оптимуму бычьего химозина [14]. В диапазоне 32–37 °С все молоко-свертывающие ферменты остаются стабильными в течение длительного времени. Выбор температуры зависит от того, что важнее в конкретной задаче: воспроизвести реальные условия производства сыра или увеличить скорость реакции и уменьшить продолжительность анализа. В данном случае выбрана температура 37 °С для повышения скорости реакции и сокращения времени анализа.

Согласно международному стандарту ISO 11815:2007 | IDF 157:2007, для проведения одного определения МСА требуются значительные объемы реагентов: 25 мл субстрата и 0,5 мл раствора фермента. Хотя стандарт допускает пропорциональное уменьшение объемов до 10 мл субстрата и 0,2 мл фермента, он устанавливает строгое требование к соотношению объемов субстрата и раствора фермента 50:1, что ограничивает применение метода для скрининга большого количества образцов. Переход к микропланшетному формату позволяет радикально снизить расход реагентов, что особенно важно при разработке схем очистки рекомбинантных ферментов [12, 17, 20]. В данном методе реакция проводится в 96-луночном планшете с объемом лунок около 300 мкл. Выбран формат постановки реакции 180 мкл субстрата и 20 мкл фермента, который обеспечивает десятикратное разбавление пробы. Этого достаточно для минимизации влияния состава ферментного образца на протекание реакции. Объем дозирования фермента 20 мкл был выбран, поскольку дальнейшее уменьшение объема пробы может приводить к возрастанию погрешности дозирования и негативно влиять на воспроизводимость.

Для количественного определения МСА необходимо подобрать такую концентрацию фермента, чтобы время свертывания произошло в определенном временном интервале. В большинстве методов этот интервал составляет от 5 до 15 мин [13, 17]. Согласно международному стандарту ISO 11815:2007 | IDF 157:2007, время свертывания рабочего раствора фермента должно находиться в пределах 350–550 с. Выбор оптимального интервала времени свертывания продиктован необходимостью минимизации погрешностей, влияющих на воспроизводимость результатов. Чрезмерное сокращение времени свертывания (менее 5 мин) приводит к тому, что время технических манипуляций (дозирование и перемешивание) начинает заметно влиять на определяемое время свертывания. Кроме того, при высокой скорости реакции происходит наложение ферментативной стадии на стадию агрегации, что искажает форму кинетической кривой и затрудняет определение базовой линии [25]. С другой стороны, увеличение времени свертывания (более 15 мин) снижает производительность анализа и может влиять на стабильность фермента и субстрата. В данном методе для количественного определения МСА проводилась серия измерений МСА различных разведений препарата, подбирались такая активность фермента, при которой время свертывания составляло 5–10 мин в условиях реакции. Это позволило ограничить общий временной интервал измерения 15 мин, что увеличило скорость анализа.

Кинетические кривые свертывания имеют характерный сигмоидальный вид. В литературе описаны различные подходы к определению времени свертывания. Зачастую его определяют как момент достижения максимальной скорости роста сигнала – точку перегиба кинетической кривой (максимум первой производной или момент смены знака второй производной) [14] или методом нелинейной регрессии с использованием сигмоидальной функции. При анализе образцов с очень высокой или, что более существенно, низкой активностью могут возникать сложности расчета из-за неправильного определения базовой линии и точки перегиба. В данном методе использован альтернативный критерий фиксации времени свертывания как момент достижения фиксированного значения оптической плотности. Для определения этого значения проведена серия экспериментов для определения базового (фонового) сигнала субстрата до начала реакции и его максимального значения по окончании стадии агрегации. Показано, что свежеприготовленный мо-

лочный субстрат, содержащий 4 % СОМ, имеет среднее фоновое значение оптической плотности $OD_{880} \approx 1,7$, стабильное на протяжении всего времени анализа (рис. 1). После добавления фермента сигнал растет на протяжении всего времени анализа и постепенно выходит на асимптотическое плато, достигая в среднем значений $OD_{880} \approx 3,3$ (рис. 1). Скорость достижения $OD_{880} \approx 3,3$ зависит от активности фермента, поэтому определять время свертывания как время достижения среднего арифметического между фоновым и максимальным (за время анализа) значением OD_{880} для каждой кривой было бы некорректно. Это привело бы к невозможности объективного сравнения образцов с различной активностью. Поэтому в качестве критерия достижения времени свертывания необходим выбор единого фиксированного значения оптической плотности для всех измерений в рамках одной методики. В данном методе в качестве значения этого критерия выбрано время достижения полусуммы средних значений фонового и максимального сигнала $OD_{880} \approx (1,7 + 3,3)/2 = 2,5$. Выбранное значение оказалось близко к времени максимальной скорости роста сигнала. Значение критерия зависит от концентрации субстрата, которая определяет фоновое значение, поэтому при любом изменении концентрации субстрата критерий нужно определять заново. Использование такого критерия позволяет определить время свертывания без дополнительной математической обработки.

В описанных выше условиях протестирована активность двух молокосвертывающих ферментов: коммерческого препарата химозина СНУ-MAX Extra (рис. 1, 2) и отраслевого контрольного образца сычужного фермента (ОКО СФ) (рис. 3). Зависимость обратной величины времени свертывания (активности) от концентрации фермента хорошо описывалась линейной функцией ($R^2 > 0,98$) во всем исследованном диапазоне концентраций.

Турбидиметрические методы имеют достаточно низкий предел обнаружения химозина от 100 нг/мл [17]. В данном методе линейный диапазон измеряемых концентраций для СНУ-MAX Extra составил 500–5000 нг/мл. Метод может быть использован для определения активности молокосвертывающих ферментных препаратов рекомбинантного химозина, микробной либо растительной протеазы в стандартных единицах IMCU или УЕ. Для этого необходимо построить калибровочную кривую по стандартному образцу с известной аттестованной активностью. В данной

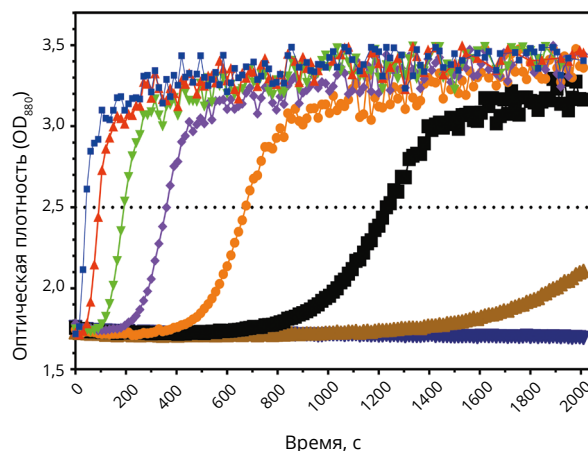
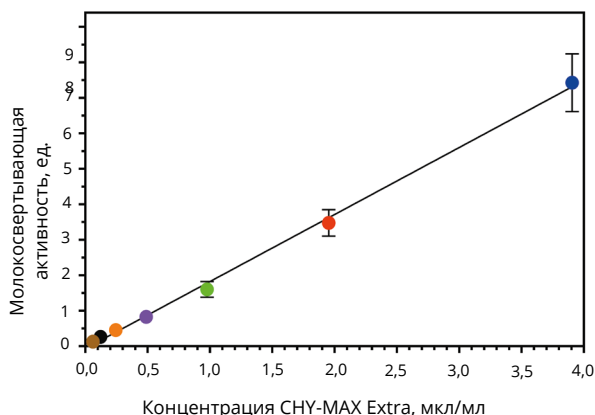
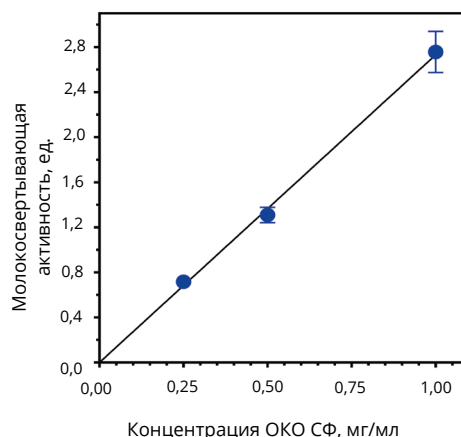


Рисунок 1. Вид кинетических кривых при различных концентрациях СНУ-MAX Extra



Примечание: концентрации СНУ-MAX Extra (3,84; 1,92; 0,96; 0,48; 0,24; 0,12; 0,06 мкл/мл) выражены в мкл исходного жидкого препарата на мл буфера; приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение для трех экспериментов.

Рисунок 2. Зависимость молокосвертывающей активности от концентрации СНУ-MAX Extra



Примечание: приведены средние значения $\pm$ стандартное отклонение для трех экспериментов.

Рисунок 3. Зависимость молокосвертывающей активности от концентрации ОКО СФ

работе в качестве эталона был использован ОКО СФ (активность 100000 ± 2500 УЕ/г). Построение калибровочной зависимости позволило установить соотношение между экспериментальными единицами активности ЕА и стандартными единицами УЕ ($1 \text{ УЕ} = 1,46 \pm 0,07 \text{ ЕА}$). На основании полученной калибровки активность препарата CHY-MAX Extra была определена как 67000 ± 3000 УЕ/мл. Это соответствует активности 536 ± 25 IMCU/мл ($1 \text{ IMCU} = 125 \text{ УЕ}$ [26]). Полученное значение близко к заявленной активности препарата CHY-MAX Extra 600 IMCU. Расхождение между полученными значениями около 10 % может быть обусловлено снижением активности жидкого препарата CHY-MAX Extra в процессе хранения и использования. Таким образом, предложенный метод может быть успешно использован для количественной оценки МСА.

Выводы

Предложенный микропланшетный турбидиметрический метод представляет собой эффективную альтернативу традиционному визуальному тесту REMCAT, устраняет субъективность оператора и обеспечивает высокую объективность результатов. Проведенный анализ параметров различных методов измерения молокосвертывающей активности позволил подобрать условия, пригодные для измерения молокосвертывающей активности широкого круга ферментов. Данный метод может активно применяться для характеристики новых рекомбинантных химозинов, а также для поиска молокосвертывающих ферментов из природных источников. Предложенный метод может быть рекомендован для использования в практике прикладных исследований в области сыроделия. ■

Поступила в редакцию: 13.04.2026

Принята в печать: 04.08.2026

Microplate Turbidimetric Assay in Determining Milk-Clotting Activity of Enzyme Preparations

Igor M. Berdyshev, Ilya V. Demidyuk

National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

Milk-clotting activity (MCA) is a key quality indicator for enzymes used in cheese production. The traditional method for determining MCA (REMCAT) relies on visual detection of the clotting endpoint. Unfortunately, it is subjective and inefficient for analyzing large numbers of samples. Microplate turbidimetric methods can serve as an alternative, enabling objective and high-throughput MCA measurements. We analyzed the critical parameters governing the reaction (pH, buffer composition, temperature, calcium ion concentration, substrate concentration, and measurement wavelength) to select conditions for effective MCA determination. Our method is a simplified approach for determining the clotting time based on reaching a fixed optical density value. We tested the method using a recombinant chymosin preparation, CHY-MAX Extra. The experiment demonstrated a linear dependence of activity on enzyme concentration ($R^2 > 0.98$) in the range of 500–5,000 ng/ml. Calibration with a standard milk-clotting enzyme reference made it possible to express the results in conventional units. The method enables quantitative assessment of total MCA with minimal consumption of enzyme and substrate. The new protocol represents an effective tool for high-throughput screening of novel recombinant and natural milk-clotting enzymes, providing rapid analysis and straightforward data processing.

Keywords: chymosin, milk-clotting activity, microplate turbidimetric assay, cheesemaking

Список литературы:

1. **Juste, E.** Milk gel formation and properties: impact of whey protein aggregates / E. Juste, J. Lee, T. Croguennec // *International Dairy Journal*. 2025. Vol. 169. Art. no. 106354. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2025.106354>
2. **Kübarsepp, I.** A comparison of the methods for determination of the rennet coagulation properties of milk / I. Kübarsepp [et al.] // *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*. 2005. Vol. 55(4). P. 145–148. <https://doi.org/10.1080/09064700500453377>
3. **Caeiro, J. J.** Comparison of milk-clotting activity measurement using the Berridge's operator-based approach and a proposed digital method / J. J. Caeiro [et al.] // *International Dairy Journal*. 2024. Vol. 159. Art. no. 106055. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106055>
4. **Loddo, A.** Detecting coagulation time in cheese making by means of computer vision and machine learning techniques / A. Loddo [et al.] // *Computers in Industry*. 2025. Vol. 164. Art. no. 104173. <https://doi.org/10.1016/j.compind.2024.104173>
5. **You, H.** Ratiometric fluorescent detection of protease activity in foods based on microwave-assisted synthesized casein-directed gold nanoclusters / H. You [et al.] // *Food Chemistry*. 2025. Vol. 474. Art. no. 143078. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143078>
6. **Ben Amira, A.** Milk-clotting properties of plant rennets and their enzymatic, rheological, and sensory role in cheese making: a review / A. Ben Amira [et al.] // *International Journal of Food Properties*. 2017. Vol. 20(supl). P. S76–S93. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1289959>
7. **Jensen, J. L.** The function of the milk-clotting enzymes bovine and camel chymosin studied by a fluorescence resonance energy transfer assay / J. L. Jensen [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2015. Vol. 98(5). P. 2853–2860. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8672>
8. **Lu, X.** A novel fluorescence sensor for milk clotting enzyme chymosin using peptide as substrate and covalent organic framework nanosheet as fluorescence quencher / X. Lu [et al.] // *Food Science and Human Wellness*. 2024. Vol. 13(6). P. 3606–3613. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2023.9250042>

9. **Wiśniewski, P.** Invited review: Milk-clotting enzymes of microbial origin and their role in cheesemaking—A review / P. Wiśniewski [et al.] // *Journal of Dairy Science*. 2025. Vol. 108(10). P. 10427–10446. <https://doi.org/10.3168/jds.2025-26973>
10. **Arbita, A. A.** Milk clotting enzymes from marine resources and their role in cheese-making: a mini review / A. A. Arbita, J. Zhao // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2024. Vol. 64(27). P. 10036–10047. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2220030>
11. **Nicosia, F. D.** Plant milk-clotting enzymes for cheesemaking / F. D. Nicosia [et al.] // *Foods*. 2022. Vol. 11(6). Art. no. 871. <https://doi.org/10.3390/foods11060871>
12. **Akishev, Z.** Obtaining of recombinant camel chymosin and testing its milk-clotting activity on cow's, goat's, ewes', camel's and mare's milk / Z. Akishev [et al.] // *Biology*. 2022. Vol. 11(11). Art. no. 1545. <https://doi.org/10.3390/biology11111545>
13. **Kappeler, S. R.** Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation of bovine and camel milk / S. R. Kappeler [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2006. Vol. 342(2). P. 647–654. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.02.014>
14. **Jiang, X. P.** Constitutive expression, purification and characterization of bovine prochymosin in *Pichia pastoris* GS115 / X. P. Jiang [et al.] // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 28(5). P. 2087–2093. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1012-7>
15. **Ali Hanoğlu, S.** Recombinant expression and characterization of *Oryctolagus cuniculus* chymosin in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) / S. Ali Hanoğlu, D. Ektiren, M. Karaaslan // *Protein Expression and Purification*. 2021. Vol. 183. Art. no. 105874. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105874>
16. **Vallejo, J. A.** Cloning and expression of buffalo active chymosin in *Pichia pastoris* / J. A. Vallejo [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008. Vol. 56(22). P. 10606–10610. <https://doi.org/10.1021/jf802339e>
17. **Dunn-Coleman, N. S.** Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus* / N. S. Dunn-Coleman [et al.] // *Biotechnology*. 1991. Vol. 9(10). P. 976–981. <https://doi.org/10.1038/nbt1091-976>
18. **Gilliland, G. L.** Functional implications of the three-dimensional structure of bovine chymosin / G. L. Gilliland, M. T. Oliva, J. Dill // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1991. Vol. 306. P. 23–37. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6012-4_3
19. **Zhang, Y.** Quantifying protein residues in APIs: Bradford assay mechanism and limitations, outperformed by HILIC-MS/MS / Y. Zhang [et al.] // *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2026. Vol. 16(7). Art. no. 101552. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2026.101552>
20. **Akishev, Z.** Constitutive expression of *Camelus bactrianus* prochymosin B in *Pichia pastoris* / Z. Akishev [et al.] // *Heliyon*. 2021. Vol. 7(5). Art. no. e07137. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07137>
21. **Wang, N.** Expression and characterization of camel chymosin in *Pichia pastoris* / N. Wang [et al.] // *Protein Expression and Purification*. 2015. Vol. 111. P. 75–81. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.03.012>
22. **Nájera, A. I.** Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet-clotting properties of milk: a multifactorial study / A. I. Nájera, M. de Renobales, L. J. R. Barron // *Food Chemistry*. 2003. Vol. 80(3). P. 345–352. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00270-4)
23. **Nicolau, N.** Estimation of clotting and cutting times in sheep cheese manufacture using NIR light backscatter / N. Nicolau [et al.] // *Dairy Science & Technology*. 2015. Vol. 95. P. 495–507. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0232-7>
24. **Tabayehnejad, N.** Comparison of total milk-clotting activity measurement precision using the Berridge clotting time method and a proposed optical method / N. Tabayehnejad, M. Castillo, F. A. Payne // *Journal of Food Engineering*. 2012. Vol. 108(4). P. 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.009>
25. **Castillo, M. Z.** Modelling casein aggregation and curd firming in goats' milk from backscatter of infrared light / M. Z. Castillo [et al.] // *Journal of Dairy Research*. 2003. Vol. 70(3). P. 335–348. <https://doi.org/10.1017/S0022029903006356>
26. **Пушкарев, В. А.** Молокосвертывающая и общая протеолитическая активность инженерного варианта рекомбинантного химозина северного оленя (*Rangifer tarandus*) / В. А. Пушкарев [и др.] // *Сыроделие и маслоделие*. 2023. № 1. С. 22–25. <https://doi.org/10.31515/2073-4018-2023-1-22-25>; <https://elibrary.ru/uarlcp>

Источник изображения: magnific.com

